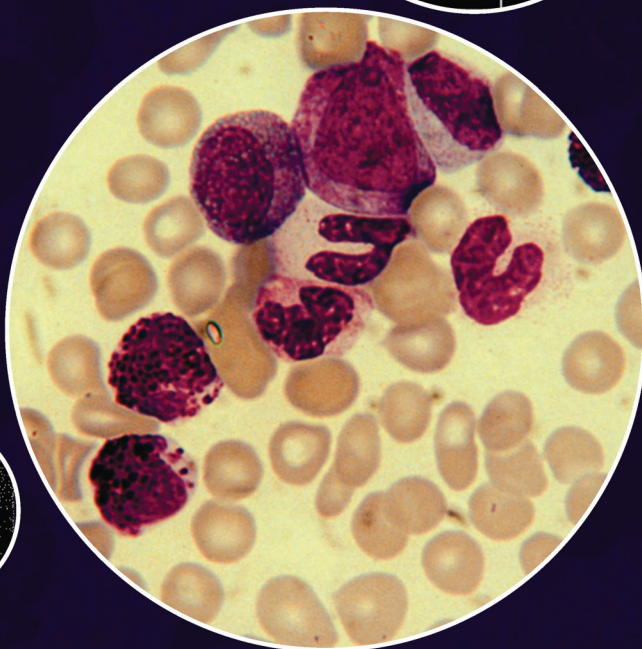
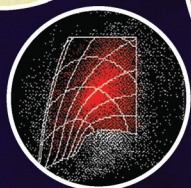
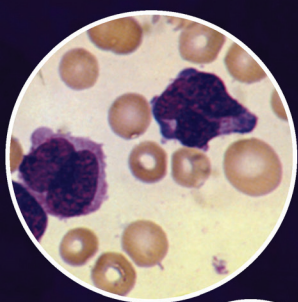
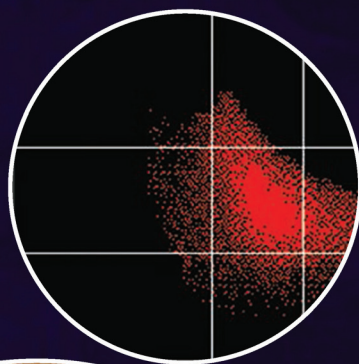


CÉLULAS SANGUÍNEAS

Um Guia Prático

5ª edição



BARBARA J. BAIN



Tradução técnica:

Renato Failace

Professor titular (inativo) de Hematologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Professor adjunto (inativo) de Medicina Interna da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Especialista em Hematologia e Patologia Clínica pela Associação Médica Brasileira.



B162c Bain, Barbara J.

Células sanguíneas : um guia prático [recurso eletrônico] / Barbara J. Bain ; [tradução: Renato Failace]. – 5. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2016.

Editado como livro impresso em 2016.

ISBN 978-85-8271-331-0

1. Medicina – Hematologia. 2. Sangue. I. Título.

CDU 616.15

Catálogo na publicação: Poliana Sanchez de Araujo – CRB 10/2094

CÉLULAS SANGUÍNEAS

Um Guia Prático

5ª edição

BARBARA J. BAIN

MBBS, FRACP, FRCPath

Professor in Diagnostic Haematology

St Mary's Hospital Campus of Imperial College Faculty of Medicine, London

and Honorary Consultant Haematologist,

St Mary's Hospital, London

Versão impressa
desta obra: 2016



2016

Obra originalmente publicada sob o título *Blood cells: a practical guide*, 5th edition
ISBN 9781118817339 / 1118817338

Copyright © 2015, John Wiley & Sons Limited. All Rights Reserved. Authorised translation from the English language edition published by John Wiley & Sons Limited. Responsibility for the accuracy of the translation rests solely with Artmed Editora Ltda. and is not the responsibility of John Wiley & Sons Limited. No part of this book may be reproduced in any form without the written permission of the original copyright holder, John Wiley & Sons Limited.

Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

Colaboraram nesta edição:

Editora: *Daniela de Freitas Louzada*

Arte sobre capa original: *Kaêlle Finalizando Ideias*

Preparação de originais: *Patrícia Alves da Silva*

Leitura final: *Caroline Castilhos Melo*

Editoração: *Estúdio Castellani*

Nota

A medicina é uma ciência em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a experiência clínica ampliam o nosso conhecimento, são necessárias modificações no tratamento e na farmacoterapia. A autora desta obra consultou as fontes consideradas confiáveis, num esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da publicação. Entretanto, tendo em vista a possibilidade de falha humana ou de alterações nas ciências médicas, os leitores devem confirmar estas informações com outras fontes. Por exemplo, e em particular, os leitores são aconselhados a conferir a bula de qualquer medicamento que pretendam administrar, para se certificar de que a informação contida neste livro está correta e de que não houve alteração na dose recomendada nem nas contraindicações para o seu uso. Essa recomendação é particularmente importante em relação a medicamentos novos ou raramente usados.

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
ARTMED® EDITORA S.A.

Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana

90040-340 Porto Alegre RS

Fone (51) 3027-7000 Fax (51) 3027-7070

SÃO PAULO

Rua Doutor Cesário Mota Jr., 63 – Vila Buarque

01221-020 São Paulo SP

Fone (11) 3221-9033

SAC 0800 703-3444 – www.grupoa.com.br

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

Agradecimentos

Agradeço aos que fizeram revisões críticas de partes desta e das edições anteriores deste livro, incluindo Carol Briggs, que revisou o atual Capítulo 2. Agradeço, igualmente, aos inúmeros colegas que forneceram lâminas de sangue para fotografia, ou outras imagens; todos são mencionados individualmente na legenda das figuras. Sou grata também a centenas de outros profissionais com quem discuti problemas diagnósticos interessantes e difíceis nos últimos 43 anos. Gostaria que fosse reconhecida a colaboração da Dra. Helen

Dodsworth: se sua sugestão aos editores não houvesse ocorrido, esta obra talvez nunca tivesse sido publicada. Finalmente, gostaria de lembrar e agradecer aos que me ensinaram a examinar distensões sanguíneas, em especial ao já falecido Professor Sir John Dacie, bem como aos já falecidos Professores David Galton e Sunitha Wickramasinghe, e ao Prof. Daniel Catovsky, felizmente ainda presente entre nós.

Barbara J. Bain

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Prefácio

Células sanguíneas foi escrito visando tanto o hematologista já em atividade como o estudante de Hematologia. Meu desejo foi elaborar um guia para uso no laboratório de hematologia diagnóstica, abrangendo desde os métodos de coleta, preparação e coloração de distensões de sangue, tecnologia de contagens de glóbulos manual e automatizada, até a avaliação dos aspectos morfológicos das células sanguíneas. Tentei fazê-lo de modo que o profissional de hematologia o considerasse compreensivo para usá-lo como fonte de referência e, ao mesmo tempo, se prestasse ao hematologista em treinamento e ao pessoal biomédico como um manual simples e prático para uso diário. Espero que o estudante de hematologia clínica obtenha, com esta obra, uma melhor compreensão da base científica deste importante segmento da hematologia de laboratório, e o cientista de laboratório compreenda melhor as finalidades e a relevância clínica dos exames que executa. Acredito não ser demasiado ambicioso desejar que o livro seja “tudo para todos”.

Esta edição foi ampliada para manter-se tão completa e atual quanto possível e incluir orientação para a escolha dos exames adicionais que devem ser feitos para confirmação da generalidade dos diagnósticos presuntivos. A microscopia e a parte técnica das contagens de glóbulos automatizadas permanecem como o *core* da obra. Meu propósito principal foi mostrar que a microscopia não somente fornece a essência da prática hematológica, mas também pode levar ao estímulo da descoberta. A diminuição do número de amostras de sangue que são levadas à microscopia e a ampliação das áreas de atuação do hematologista, tanto em laboratório como na clínica, tornam este livro, mais do que nunca, necessário. Pensei que a 4ª edição, publicada há oito anos, seria minha última, mas me pareceu uma pena parar quando ainda há aprendizagens novas acerca das células sanguíneas circulantes. Se tiver êxito em reaproximar o leitor do microscópio, com interesse e entusiasmo renovados, estarei satisfeita.

Barbara J. Bain

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Lista de abreviaturas

ANAE	α -naftilacetato esterase	HEMPAS	multinuclearidade eritroide com teste com soro acidificado positivo (anemia diseritropoética congênita tipo II)
ANBE	β -naftilbutirato esterase		
APAAP	fosfatase alcalina-antifosfatase alcalina		
ATP	trifosfato de adenosina	HHV6	herpesvírus humano tipo 6
CAE	cloroacetato esterase	HIV	vírus da imunodeficiência humana adquirida
CD	<i>cluster designation</i> ou <i>cluster of differentiation</i>	HLA	antígenos leucocitários de histocompatibilidade
CDC	Center(s) for Disease Control (nos EUA)	HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
CHr	hemoglobina corpuscular dos reticulócitos	HPN	hemoglobinúria paroxística noturna
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média	HTLV-I	vírus linfotrópico das células-T humano tipo I
CMV	citomegalovírus	HTLV-II	vírus linfotrópico das células-T humano tipo II
CTCN	contagem total de células nucleadas	ICSH	International Committee (agora Council) for Standardization in Haematology
CV	coeficiente de variação		
DDAVP	1-deamino-8-D-arginina vasopressina	IL	interleuquina
DNA	ácido desoxirribonucleico	LAP	fosfatase alcalina nos leucócitos (neutrófilos)
DP	desvio-padrão	LCAT	lecitina-colesterol aciltransferase
E	contagem de eritrócitos	LCTA	linfoma de células T do adulto
EBV	vírus de Epstein-Barr	LDH	desidrogenase láctica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético	LE, célula	lúpus eritematoso, célula do linfoma esplênico com linfócitos vilosos
FAB	francoamericano-britânica (classificação de neoplasias hematológicas)	LELV	
FDA	Food and Drug Administration	Leuco	contagem de leucócitos (em <i>Teste seus conhecimentos</i>)
FISH	hibridização fluorescente <i>in situ</i>	LI	índice de lobularidade
FITC	isotiocianato de inositina	LLA	leucemia linfoblástica aguda
G6PF	glicose-6-fosfato desidrogenase	LLAT	leucemia/linfoma T do adulto
G-CSF	fator estimulante de colônias granulocíticas	LLA-T	leucemia linfoblástica aguda de linhagem T
GM-CSF	fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos	LLC	leucemia linfocítica crônica
GPI	glicosilfosfatidil-inositol	LLC/LPL	leucemia linfocítica/prolinfocítica (tipo misto)
Hb	hemoglobina, dosagem de hemoglobina	LMA	leucemia mieloide aguda
HCM	hemoglobina corpuscular média	LMC	leucemia mieloide crônica
Hct	hematócrito	LMMC	leucemia mielomonocítica crônica
HDW	amplitude de distribuição (corpuscular) da hemoglobina	LPL	leucemia prolinfocítica
HELLP	hemólise, elevação das enzimas hepáticas, baixa contagem de plaquetas (síndrome)	LPL-B	leucemia prolinfocítica de linhagem B
		LPL-T	leucemia prolinfocítica de linhagem T

LUC	células grandes não coradas	POEMS	polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína M, alterações dermatológicas (síndrome)
MALT	tecido linfóide associado à mucosa		
M-CSF	fator estimulante de colônias macrofágicas	Pct	plaquetócrito
MGG	May-Grünwald-Giemsa (corante)	PHA	fito-hemaglutinina
MIRL	inibidor da membrana da lise reacional	PMDW	amplitude de distribuição da massa plaquetária
MPC	concentração média de componentes plaquetários	PTI	púrpura trombocitopênica imunológica (idiopática)
MPM	massa plaquetária média	PTT	púrpura trombocitopênica trombótica
MPO	mieloperoxidase	PV	policitemia vera
MPXI	índice médio de peroxidase	RDW	amplitude de distribuição (volumétrica) dos eritrócitos
NASA	naftol-AS acetato esterase		
NASDA	naftol-AS-D acetato esterase	RNA	ácido ribonucleico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards	RT-PCR	transcriptase reversa reação em cadeia da polimerase
NK	<i>natural killer</i> (linfócitos)		
NRBC	eritroblastos (<i>nucleated red blood cells</i>)	SBB	<i>sudan black B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde	SHE	síndrome hipereosinofílica idiopática
PAS	ácido periódico de Schiff		
PCDW	amplitude de distribuição dos componentes plaquetários	SI	sistema internacional (de unidades)
PCR	reação em cadeia da polimerase	SMD	síndrome(s) mielodisplásica(s)
PCV	<i>packed cell volume</i> (substituído por Hct = hematócrito)	TAR	trombocitopenia e ausência dos rádios (síndrome)
PDW	amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas	TRAP	fosfatase ácida tartarato-resistente
Peg-rHuMGDF	fator recombinante humano de desenvolvimento e crescimento megacariocítico polietileno-glicosilado	VCM	volume corpuscular médio
		VPM	volume plaquetário médio
		VSG	velocidade de sedimentação globular
		WIC	contagem de leucócitos no canal de impedância (contador Cell-Dyn)
PHHF	persistência hereditária da hemoglobina fetal	WOC	contagem de leucócitos no canal óptico (contador Cell-Dyn)

Nota ao leitor

Salvo especificação em contrário, todas as microfotografias são de preparações coradas com MGG e foram fotografadas com uma objetiva de aumento 100 ×, com uma amplificação final de 912 × aproximadamente.

Sumário

Capítulo 1	Coleta e distensão de sangue para exame, 1
Capítulo 2	Técnicas de contagem de glóbulos, 17
Capítulo 3	Morfologia das células sanguíneas, 67
Capítulo 4	Deteção de erros nas contagens de glóbulos, 186
Capítulo 5	Valores de referência, 211
Capítulo 6	Alterações quantitativas das células sanguíneas, 232
Capítulo 7	Exames complementares importantes, 277
Capítulo 8	Distúrbios dos eritrócitos e das plaquetas, 295
Capítulo 9	Distúrbios dos leucócitos, 416
	Índice, 483

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

CAPÍTULO 1

Coleta e distensão de sangue para exame

Coleta de sangue

Para uma exata contagem de glóbulos e uma correta interpretação da microscopia, é necessário que o sangue seja coletado com a quantidade correta de anticoagulante adequado e entregue sem demora ao laboratório, a fim de que não ocorram alterações artefatuais.

A identidade do paciente deve ser cuidadosamente conferida antes da coleta. Isso é feito pedindo-lhe que repita nome, sobrenome e data de nascimento; em pacientes de hospital, deve ser conferida a pulseira de identificação, que, além desses dados, possui um número de registro. Para diminuir a chance de erro humano, os tubos recipientes devem ser rotulados no ato da coleta, não previamente. O técnico que fará a flebotomia deve conhecer e seguir as recomendações para essa tarefa, incluindo as de identificação. Embora a identificação de pacientes costume ser mais rigorosa no setor de transfusões de sangue, note-se que já foram feitos tratamentos equivocados devido a trocas de resultados de hemogramas, por isso a necessidade de igual rigor na identificação em todos os setores. Identificação mais segura dos pacientes internados pode ser obtida por meio de dispositivos eletrônicos, em que um código de barras na pulseira de identificação é lido com um *scanner* manual.

Os pacientes devem sentar-se ou deitar-se de modo confortável e serem assegurados de que o procedimento provoca um desconforto mínimo, mas não de que seja indolor, porque não é. É preferível que os pacientes apreensivos fiquem deitados. Cadeiras de coleta por punção venosa devem ter braços ajustáveis, tanto por conveniência para o posicionamento do braço do paciente quanto para maior segurança, dificultando uma queda no caso de, se o paciente desmaiar. Observei pessoalmente um paciente sofrer fratura do crânio ao desmaiar e cair da cadeira; e dois outros pacientes, nenhum

deles sabidamente epilético, sofreram convulsões durante a punção venosa. Podem não ter sido convulsões realmente epiléticas, mas decorrentes da hipoxia cerebral durante a breve parada cardíaca da reação vasovagal [1]. Quando punções venosas são feitas em crianças ou em pacientes não cooperativos, o braço deve ser imobilizado de maneira firme, mas delicada, por um assistente. O coletador deve usar luvas para sua proteção; luvas de material diferente do látex devem estar disponíveis para flebotomistas e pacientes alérgicos a esse material. Para resguardar a esterilidade, a agulha não pode ser tocada.

Em certas eventualidades, o paciente deve repousar antes da coleta. Quando são testados atletas de esportes de resistência para o “passaporte biológico”, são suficientes 10 minutos de descanso em cadeira para que hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb) diminuam a um nível estável [2].

Sangue venoso periférico

No adulto, o sangue é geralmente coletado de veias da fossa antecubital (Figura 1.1) com agulha e seringa ou tubo a vácuo. Dentre as veias da dobra do cotovelo, a veia cubital mediana é a preferida, por ser mais grossa e fixada aos tecidos subjacentes, mas a cefálica e a basílica são igualmente satisfatórias; complicações são mais frequentes à punção da veia basílica do que à das demais. Outras veias do antebraço podem ser utilizadas, porém, são mais móveis e mais difíceis de punccionar. Veias no dorso do pulso ou da mão têm fluxo escasso, e a punção facilmente provoca hematoma local; o mesmo ocorre na face anterior do pulso, onde a punção, além disso, é mais dolorosa e há mais risco de dano a estruturas vitais. Veias do pé não são pontos ideais para a coleta de sangue, e raramente há necessidade de usá-las. Danos locais, às vezes associados a punções venosas na fossa antecubital, incluem lesão ao nervo cutâneo antebraquial lateral [3] e punção arterial, ambas por engano. Na necessidade de punção

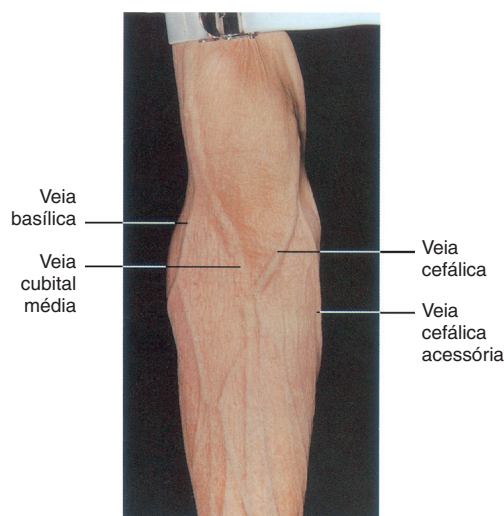


FIGURA 1.1 Face anterior do braço esquerdo mostrando as veias mais adequadas para a punção venosa.

de veias do pulso, o risco é o dano aos nervos e artérias radiais ou ulnares. Em punções das veias do pé, há maior risco de complicações trombóticas, infecção ou difícil cicatrização.

Quando se escolhe uma veia, deve-se palpá-la para ver se é patente; neste caso, é macia e compressível. Uma veia trombosada não é compressível; palpa-se como um cordão. Uma artéria tem a parede grossa e pulsa. Se nenhuma veia for visível, o que é comum em peles escuras ou em pessoas obesas, deve-se procurá-las por palpação, com uso de garrote para distendê-las. Em caso de veias muito finas, aquece-se a área e bate-se delicadamente no braço para produzir vasodilatação e pede-se que o paciente abra e feche a mão algumas vezes.

Deve-se considerar que têm sido cultivadas bactérias patogênicas de garrotes reutilizáveis; é prática prudente usar garrotes descartáveis, ao menos em pacientes sob alto risco de infecções [4].

O braço do paciente deve ser posicionado no braço da cadeira de modo que a veia escolhida fique sob tensão e com mobilidade reduzida. Deve-se desinfetar a pele com etanol a 70% ou clorexidina a 0,5% e deixá-la secar, para não arder com a punção. O garrote deve ser aplicado com tensão suficiente para distender a veia, mas não a ponto de causar desconforto; um manguito de pressão arterial, inflado à pressão diastólica, pode ser usado, mas um garrote comum é preferível. Se for particularmente importante obter uma amostra sem hemoconcentração, por exemplo, em paciente com

suspeita de poliglobulia, o torniquete deve ser liberado logo após a penetração na veia; na rotina, pode ser mantido até o fim da coleta. Embora recomende-se manter o garrote no máximo por 1 minuto, a hemoconcentração que provoca é mínima mesmo após 10 minutos. Em uma publicação, o aumento das cifras hematimétricas foi de 2% após 2 e o mesmo após 10 minutos [5]. Em outra publicação, entretanto, a Hb elevou-se 0,9 g/dL após 3 minutos; Ht e contagem de eritrócitos elevaram-se proporcionalmente [6].

O sangue pode ser coletado com agulha e tubo a vácuo (ver a seguir), ou com agulha ou escalpe (*butterfly*), pequena agulha com aletas e cânula, e seringas. O escalpe reduz o risco de lesão a estruturas nervosas [7] e é preferível para veias finas e locais difíceis. Agulhas de 0,9 e 0,8 mm (19 ou 20 *gauge*) de calibre são próprias para adultos, e de 0,7 e 0,6 mm (21 ou 23 *gauge*), para crianças ou adultos com veias muito finas. Quando se usa seringa, deve-se mover previamente o êmbolo, ida e volta, para descolá-lo da camisa. Depois adapta-se a agulha à seringa, preferindo-se as de bico lateral, salvo quando de 5 mL ou menores. O protetor da agulha é removido e a agulha é inserida na veia, com o bisel para cima (Figura 1.2). Isso pode ser feito com um único movimento ou com dois movimentos, um para a pele e outro para a veia, de acordo com a preferência do coletador e com a profundidade da veia. Com uma das mãos firmando a camisa da seringa para que a agulha não saia da veia, aspira-se o sangue tracionando o êmbolo com a outra mão, de modo a desenvolver mínima pressão negativa. Não se deve aspirar mais rapidamente do que a entrada do sangue na veia, pois a parede colaba sobre o bisel e estanca o fluxo. É importante sempre liberar o garrote antes de retirar a agulha ao completar a coleta. Em seguida, deve-se aplicar pressão digital sobre o local puncionado, com algodão ou gaze, mantendo-se o braço esticado, na horizontal ou um pouco elevado. O adesivo só deve ser colocado após pressão por tempo suficiente para o estancamento.

A agulha deve ser destacada da seringa antes de se expelir o sangue para o contêiner*, caso este tenha tampa removível; é necessário cuidado para evitar ferimentos com a ponta. A agulha deve ser descartada em um receptáculo especial para objetos pontiagudos, sem recolocação do protetor.

* N. de T. No Brasil, são usados, na grande maioria das vezes, frascos a vácuo industrializados.

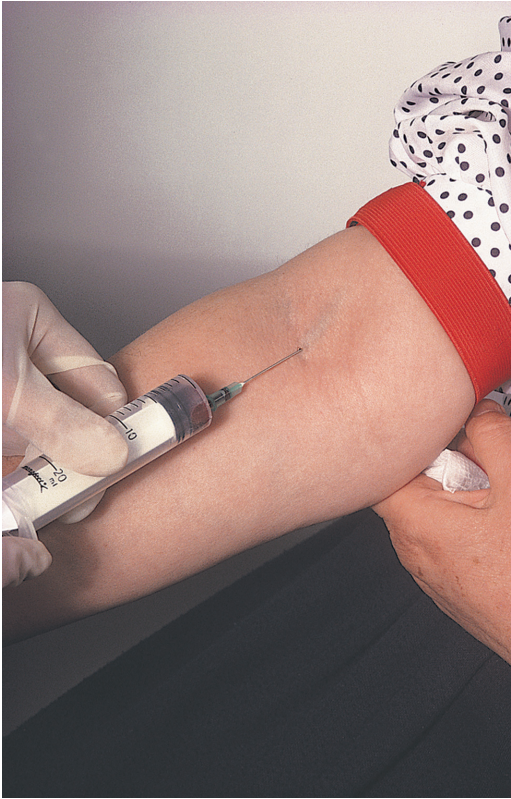


FIGURA 1.2 Técnica de punção venosa utilizando seringa e agulha.

A amostra de sangue é expelida delicadamente no frasco ou tubo contendo o anticoagulante e é misturada com este, invertendo-se o contêiner quatro ou cinco vezes. A ejeção violenta pode causar hemólise; deve-se evitar, também, sacudir o contêiner. A amostra é, então, rotulada com o nome do paciente e com os demais dados de identificação e/ou, dependendo da rotina do serviço, com um código de barras, também aplicado à requisição do exame e depois à lâmina com o sangue distendido. Os contêineres não devem ser rotulados de antemão, longe do paciente, a fim de evitar trocas. A hora da coleta deve ser anotada no rótulo; isso é importante para permitir que o médico relacione o resultado com as condições do paciente naquele momento e para o laboratório verificar que não tenha havido atraso indesejado entre a coleta e a execução do exame.

Sistemas de coleta com tubos a vácuo incluem Vacutainer (Beckton-Dickinson) e Vacuette (Greiner Bio-One). Quando o sangue é coletado em tubos a vácuo, o procedimento é essencialmente o mesmo.

Uma agulha bipolar é atarrachada em um suporte que facilita a manipulação para a punção venosa (Figura 1.3). Alternativamente, um escalpe pode ser atarraxado a um tubo a vácuo por meio de um adaptador. Uma vez penetrada a veia, o tubo a vácuo é introduzido no suporte e pressionado para a frente; a ponta traseira da agulha fura a rolha e o sangue é aspirado para o tubo (Figura 1.4). Os tubos a vácuo são muito convenientes quando são necessárias amostras múltiplas; nestes casos, vários tubos são aplicados sucessivamente. Todos os tubos devem ser estéreis. Para crianças e pacientes com veias muito finas, devem ser escolhidos tubos pequenos, com menor rarefação, para evitar que a aspiração excessiva faça colabar a veia. Uma vez cheios os tubos necessários, a agulha é retirada da veia, ainda ligada ao suporte. Para evitar ferimentos com a ponta da agulha, deve haver: (i) um dispositivo apropriado, anexado à

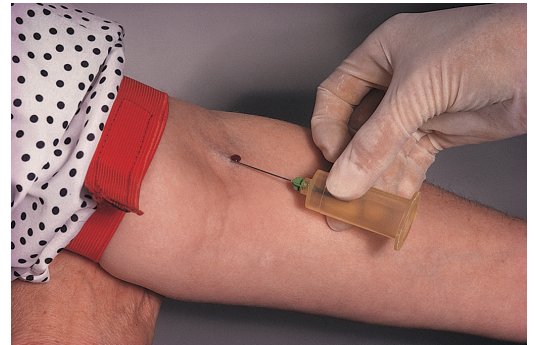


FIGURA 1.3 Técnica de punção venosa utilizando um contêiner a vácuo; a extremidade distal da agulha foi atarraxada ao suporte, e a extremidade proximal foi introduzida na veia, após removido o protetor.

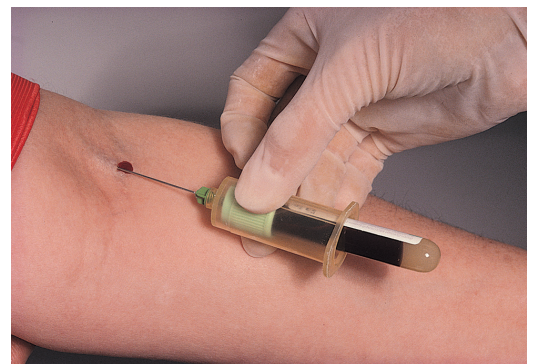


FIGURA 1.4 Técnica de punção venosa utilizando um contêiner a vácuo; o contêiner a vácuo foi introduzido no suporte e impelido em direção à ponta da agulha.

agulha, que permite que esta seja removida e descartada com o movimento de apenas uma mão; (ii) um dispositivo especial de segurança para retirada da agulha do suporte; ou (iii) alternativamente o descarte do suporte junto com a agulha. O sangue deve ser prontamente misturado ao anticoagulante com várias inversões dos tubos. Quando se usa uma sequência de tubos, o anticoagulante de um pode contaminar o subsequente. A heparina interfere nos testes de coagulação; o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na dosagem de cálcio; o fluoreto, nos testes de hematologia. Recomenda-se, por isso, seguir a sequência preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), agora denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), apresentada na Tabela 1.1 [5].

Se forem necessárias uma amostra grande ou várias pequenas, sempre deve-se usar um sistema de tubos a vácuo ou um conjunto de seringa com escalpe e cânula. Neste segundo caso, a extremidade livre do conduto pode ser pinçada para permitir que sucessivas seringas sejam afixadas. Essa técnica é muito útil para crianças e para punção de veias finas e difíceis. Nunca se deve coletar sangue acima de um local de infusão venosa, pela possibilidade de diluição; a punção abaixo, entretanto, não costuma causar imprecisão significativa.

“Sangue capilar”

Em bebês, lactentes e adultos com veias muito difíceis, pode ser necessária a coleta de sangue por picada na pele. O sangue dito “capilar”, que é mais provavelmente arteriolar, pode ser obtido de corte feito com uma lanceta estéril na superfície plantar do calcanhar, aquecido e desinfetado, em bebês e crianças com menos de 2 anos; na face plantar do grande artelho em crianças de até 2 anos e em um

dos dedos em crianças maiores e adultos. A Figura 1.5 mostra o local próprio para a picada do calcanhar em bebês ou lactentes; as faces laterais e posterior devem ser evitadas, porque o osso subjacente está muito próximo. Em pacientes maiores, são preferíveis picadas nos dedos, excluindo-se o quinto; a picada do lóbulo da orelha deve ser evitada, porque, se o paciente tiver um defeito hemostático, será difícil aplicar pressão local para o estancamento. A superfície palmar da falange distal é o local preferido do dedo, pois o osso está mais próximo da pele nos demais segmentos. O dedo médio ou o anular da mão não dominante são os preferidos, pois a dor é menor do que no indicador. Em adultos, a picada deve ultrapassar 1,5 mm de profundidade para atingir a junção entre a derme e o subcutâneo, ou seja, a zona mais vascularizada, de onde o sangue flui livremente. Lancetas usadas para bebês a termo não devem exceder 2,4 mm, pois essa é a profundidade da pele ao osso calcâneo. Lancetas mais curtas estão disponíveis e devem ser preferidas para prematuros. Já foi

TABELA 1.1 Ordem recomendada pelo NCCLS* na coleta de amostras de sangue [8]

Tubos de hemocultura
Tubos secos para amostras de soro
Tubos com citrato de sódio
Tubos com gel separador/tubos secos para amostras de soro
Tubos com heparina/tubos com heparina e gel separador
Tubos com EDTA
Tubos com fluoreto para glicose

*National Committee of Clinical Laboratory Standards, agora denominado Clinical and Laboratory Standards Institute.
EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.

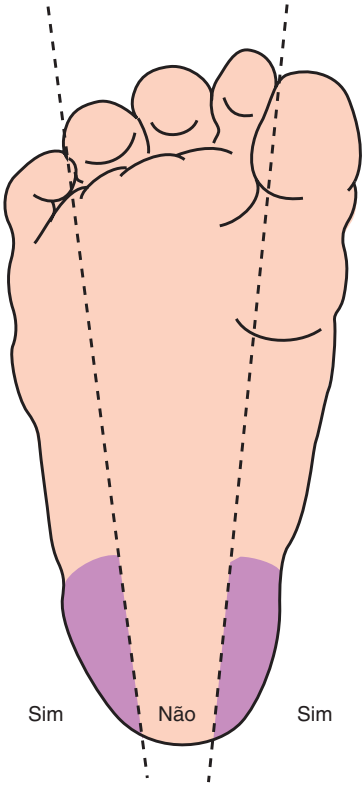


FIGURA 1.5 Áreas do pé do bebê, ou do lactente, adequadas para a obtenção de sangue capilar.

descrita osteomielite do calcâneo por punção mais profunda nesse local [9]. Deve ser evitada a repetição de picadas em um mesmo local, pelo risco de infecção. Já estão sendo comercializadas lances de segurança, com lâmina que se retrai permanentemente após a primeira utilização, de modo a diminuir o risco de ferimento acidental aos coletores. Há tamanhos apropriados para adultos e crianças, para bebês a termo e prematuros.

Amostras capilares devem ser obtidas de tecidos quentes de onde se obtém um fluxo livre de sangue. Se a área estiver fria, deve ser aquecida com uma compressa impregnada com água aquecida (a não mais de 42°C). A pele deve ser desinfetada com isopropanol a 70% e seca com gaze estéril, pois traços de álcool podem causar hemólise. A primeira gota de sangue pode estar diluída com fluidos teciduais e deve ser removida com gaze estéril. Uma pressão delicada favorece a saída do sangue, mas a compressão enérgica, massageando-se a área, é inaceitável, porque dilui o sangue com fluidos teciduais.

Sangue capilar pode ser coletado em tubos capilares de vidro; estes podem ser revestidos com EDTA, mas tubos heparinizados são inadequados para hemograma, porque a heparina altera a morfologia e a coloração dos glóbulos. Existem, no comércio, pipetas descartáveis, já com diluente, apropriadas para contagens automáticas ou manuais. O uso de tubos capilares é perigoso para o coletador, pois ele pode ferir-se caso os tubos quebrem [10]. Também há necessidade de cuidado no uso de lancetas com mola, pois já foi descrita transmissão de hepatite B de um a outro paciente por falta de troca da plataforma e da lanceta entre pacientes [11]. A despeito desse risco, elas são usadas pois asseguram uma penetração de profundidade padronizada. Um equipamento comercializado, o *Tenderfoot*, parece causar menores hematomas e menos hemólise nas amostras capilares em comparação com os demais [12, 13].

Contagens de plaquetas em sangue capilar costumam dar resultado mais baixo do que em sangue venoso [14] e outros parâmetros também variam (ver Capítulo 5). A precisão da dosagem de hemoglobina em gota única de sangue capilar é insatisfatória; recomenda-se que várias gotas sejam coletadas em tubo com EDTA [15].

Sangue do cordão umbilical

Amostras de sangue podem ser coletadas do cordão umbilical imediatamente após o nascimento.

É preferível a utilização de seringa e agulha depois de realizada a limpeza do sangue da superfície com uma gaze. Espremer o cordão, para obter sangue da extremidade cortada, contamina-o com geleia de Wharton, que causa aglutinação dos eritrócitos. Os parâmetros hematológicos do sangue do cordão não são necessariamente os mesmos do sangue capilar ou venoso do recém-nascido.

Coleta de sangue fetal

Amostras de sangue fetal podem ter utilidade diagnóstica e podem ser obtidas por cordocentese. Um hemograma pode ser útil não apenas na suspeita de doença hematológica, mas também quando um feto é examinado devido a aspectos dismórficos detectados à ecografia [16].

Coleta de outros locais

Às vezes, há necessidade de coletar sangue da veia femoral ou de cânulas venosas em diversas localizações. Quando se coleta sangue de uma cânula, uma primeira porção deve ser descartada, porque vem diluída com fluido de infusão e contaminada com heparina. Em crianças pequenas, pode ser coletado sangue de veias do escalpo e das jugulares externas.

Anticoagulantes e contêineres

O anticoagulante preferido para hemograma é um dos sais do EDTA: K_2EDTA , K_3EDTA e Na_2EDTA . O anticoagulante recomendado pelo International Council (antes Committee) for Standardization in Haematology (ICSH) é o K_2EDTA , tanto em forma seca como em solução, em concentração final entre 1,5 e 2,2 mg/mL [13]. A solução tem a vantagem de permitir uma mistura mais rápida e uma menor frequência de coagulação indesejada; em tubos a vácuo com a parede coberta por EDTA, não há problema por mistura lenta. Ao usar o EDTA em solução, algumas determinações são afetadas pela diluição, principalmente se for coletado um volume escasso de sangue. O excesso de EDTA tem efeito prejudicial na morfologia dos eritrócitos em distensões coradas. O Na_2EDTA é menos solúvel do que os sais potássicos; o K_3EDTA causa desidratação dos eritrócitos e baixa o micro-hematócrito (ver Capítulo 2).

A maioria dos laboratórios atualmente usa instrumentos de contagem de glóbulos com um dispositivo aspirador das amostras, que perfura as tampas de borracha e reduz a indesejável manipulação do sangue. Para usá-los, há necessidade de escolha de

tubos com rolha de borracha apropriada, que não vaze pelo pertuito.

Diretrizes

Diretrizes para o procedimento “punção venosa” [8] e para a proteção dos coletadores e laboratoristas contra risco biológico [18] foram publicadas pelo NCCLS e persistem válidas. Recomenda-se que as “precauções standardizadas” propostas pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC), antes designadas como “precauções universais”, sejam aplicadas à flebotomia: todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infectantes. São feitas as seguintes recomendações específicas [18]:

- 1 O uso de luvas deve ser recomendado a todos os coletadores e é particularmente importante se o coletador tiver qualquer ferimento na pele, se o paciente não for cooperativo, se o coletador for inexperiente ou se o sangue estiver sendo coletado por picada na pele.
- 2 As luvas devem ser trocadas a cada paciente subsequente.
- 3 O sistema agulha-tubo a vácuo é preferível ao seringa-agulha.
- 4 Se for necessário usar seringa-agulha e transferência do sangue para um tubo, a tampa não deve ser retirada, mas perfurada, e o sangue, aspirado pelo vácuo. Para evitar ferimentos com a agulha, **o tubo não deve ser segurado na mão*** durante o procedimento, mas colocado em uma estante.

Ferimentos acidentais com agulha

Devem ser tomadas precauções para evitá-los. A hepatite B é facilmente transmitida pela picada acidental com a agulha, principalmente se o paciente for HBe-positivo. A estatística global é de 7 a 30% de contágio em acidentes envolvendo pacientes infectados; no caso de positividade HBe, a frequência de transmissão é da ordem de 20% se o técnico receber imunoglobulina anti-hepatite B após o acidente e de 30 a 40% se não a receber [19, 20]. A frequência publicada para a transmissão da hepatite C é de 0 a 7%, com média de 1,8% [22], mas, com o uso de técnicas supersensíveis, sobe a 10% [22]. Só há transmissão se o paciente for positivo para o RNA viral [21]. O HIV é muito

menos transmissível do que os vírus da hepatite, mas sempre há risco: em 3.430 casos de picada de agulha relatados até 1993, a transmissibilidade global foi de 0,46% [23]. Outras infecções potencialmente transmissíveis por esse tipo de acidente incluem malária, criptococose, tuberculose, febre hemorrágica viral e dengue [22, 28].

O risco de ferimento e contágio também existe no uso de tubos capilares, e métodos alternativos de coleta são recomendados, nos Estados Unidos, pela Food and Drug Administration (FDA) [10].

Pela impossibilidade de eliminar totalmente os acidentes de picada de agulha, todos os hospitais e laboratórios devem ter uma política para essa eventualidade. A responsabilidade deve ser compartilhada pela direção dos laboratórios e pelos serviços de segurança ocupacional. Deve-se oferecer vacina anti-HBV para todos os funcionários em risco, conferindo-se a resposta sorológica; se houver um acidente, verifica-se o título de anticorpos e é feita uma dose *booster* se necessário [18]. Técnicos com resposta insuficiente à vacina, e os que não aceitaram fazê-la, devem receber imunoglobulina anti-hepatite B e novo oferecimento da vacina. Profilaxia antirretroviral deve ser oferecida aos que forem expostos ao risco de infecção pelo HIV por picada de agulha: deve ser iniciada nas primeiras horas após a exposição e causa significativa diminuição, mas não eliminação, do risco de contágio [29]. A combinação de três fármacos antirretrovirais é atualmente preferida. As recomendações atuais dos CDC podem ser lidas no *website* <http://www.cdc.gov/hiv/risk/other/occupational.html>. O uso de nevirapina não é recomendado devido à possibilidade de toxicidade séria [30]. Ainda não é conhecida profilaxia pós-exposição eficaz para hepatite C [21], mas, em casos de infecção aguda, há consenso na indicação de interferon no tratamento, inclusive nos casos adquiridos por picada de agulha. Interferon alfa-2b em dose de 5 milhões de unidade por dia durante 4 semanas, depois 3 vezes por semana por mais 20 semanas, tem eficácia demonstrada [31]. Se não houver exame prévio rotineiro para anti-HIV em todos os funcionários, os serviços de saúde do trabalho devem pedir o armazenamento de amostras de soro congelado por ocasião do ingresso, para teste anti-HIV no caso de um acidente posterior; se essa orientação não for seguida, o pedido deve ser renovado na eventualidade de acidente com agulha de paciente soropositivo ou de estado sorológico desconhecido.

*N. de T. No Brasil, há um dispositivo que permite segurar o tubo ao perfurá-lo: um cilindro onde se insere o tubo, com uma ampla orla circular plástica protetora.

Homogeneização da amostra de sangue

O sangue deve ser adequadamente homogeneizado antes da distensão em lâmina ou de procedimentos de contagens de glóbulos. A agitação feita em misturador rotatório por 1 minuto é suficiente [32]; a inversão manual (10 vezes) também é satisfatória, desde que amostras refrigeradas sejam antes trazidas à temperatura ambiente [32].

Preparo de distensão de sangue

A distensão de sangue em lâmina pode ser feita de sangue sem anticoagulante (sangue nativo) – venoso ou capilar – ou de sangue anticoagulado com EDTA. Quelação do cálcio pelo EDTA impede a agregação plaquetária, fazendo as plaquetas se distribuírem de modo homogêneo na distensão e, assim, seu número pode ser mais bem estimado à microscopia (Figura 1.6). Distensões de sangue capilar mostram agregação plaquetária proeminente (Figura 1.7) e de sangue venoso nativo mostram pequenos agregados (Figura 1.8). Distensões de sangue nativo venoso ou de sangue capilar são isentas de artefatos provocados pela conservação e pelo anticoagulante mas, por motivo logístico, são poucos os laboratórios que ainda usam o método como rotina; o uso é obrigatório, entretanto, para investigar alterações como crenação dos eritrócitos, ou agregação de leucócitos ou plaquetas, pois podem ser

induzidas pela conservação ou pelo EDTA. Por outro lado, distensões feitas quando o sangue anticoagulado chega ao laboratório têm a vantagem de mostrar artefatos que influenciarão a validade dos resultados dos contadores eletrônicos, como a presença de filamentos de fibrina, agregados plaquetários ou crioaglutinação dos eritrócitos. A boa prática laboratorial inclui a anotação da data e da hora da chegada da amostra e a distensão de lâmina imediatamente após o recebimento. Desse modo, fica registrado o tempo decorrido em trânsito e pode ser confirmada a atribuição de alterações morfológicas ao armazenamento prolongado de sangue anticoagulado com EDTA (“artefato de armazenamento”, ver Capítulo 3).

Distensões sanguíneas são preparadas e examinadas apenas em uma fração dos hemogramas. Há diretrizes para a escolha, frente aos dados numéricos e *flags* dos resultados do contador eletrônico, de quais hemogramas devem ser complementados com microscopia [33].

Distensão manual em lâmina

As lâminas de vidro devem estar limpas e desengorduradas; não podem ser porosas, pois isso aumenta a coloração de fundo [34]. É necessária uma lâmina distensora com quinas cortadas para que a distensão seja mais estreita do que a lâmina. Se for prevista uma cobertura com lamínula, a lâmina distensora também deve ser mais estreita do que a lamínula, para que esta cubra os bordos da distensão e permita que sejam facilmente examinados ao

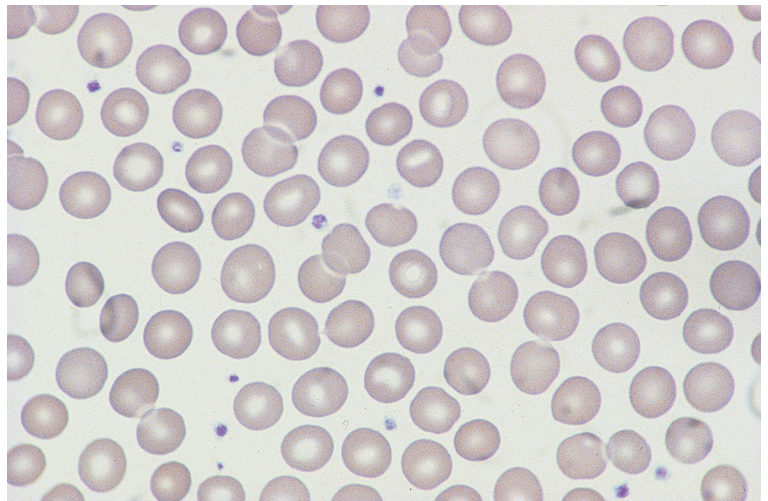


FIGURA 1.6 Distensão feita com sangue anticoagulado com EDTA, mostrando distribuição uniforme das plaquetas.

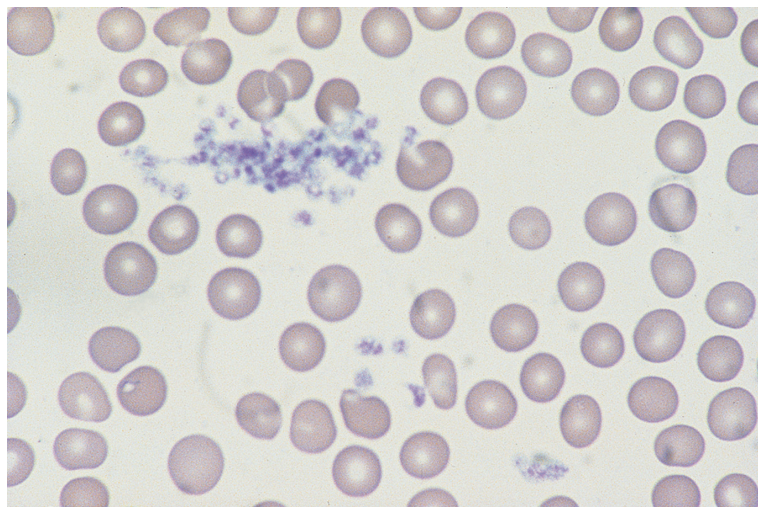


FIGURA 1.7 Distensão feita com sangue capilar não anticoagulado, mostrando a agregação plaquetária que habitualmente ocorre.

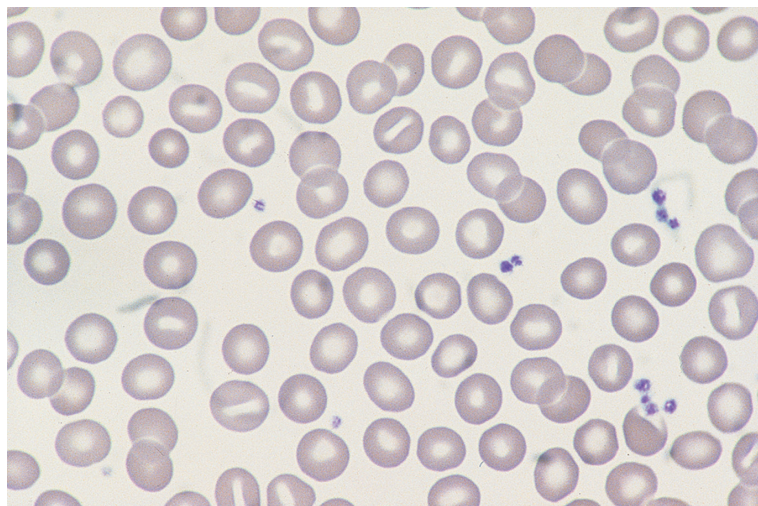


FIGURA 1.8 Distensão feita com sangue venoso não anticoagulado, mostrando o pequeno grau de agregação plaquetária que habitualmente ocorre.

microscópio. Uma distensora com bordas lisas e fácil de manipular é preparada quebrando-se as quinas de uma lâmina lapidada após marcá-las com ponteira de diamante.

O laboratorista que distende as lâminas deve usar luvas. Uma gota de sangue (nativo ou anticoagulado) é colocada próximo à extremidade da lâmina. Sangue anticoagulado, de frascos com rolha, pode ser retirado com um tubo capilar descartável. Há um dispositivo próprio para perfurar a tampa de tubos a vácuo e obter a gota de sangue. A lâmina distensora é aplicada a um ângulo de 25-30° na frente da gota de sangue e recuada até tocá-la (Figura 1.9). Uma vez espalhado o sangue ao longo da

borda posterior da distensora, esta é impelida para a frente com um movimento suave e uniforme, de modo a distender uma fina película de sangue sobre a lâmina. Se o ângulo da distensora for muito obtuso, ou o movimento for muito rápido, a distensão será muito curta. O operador experiente aprende a diferenciar o sangue com hematócrito (Hct) acima do normal, que é viscoso e exige um ângulo mais agudo para distensões satisfatórias, do sangue com baixo Hct, que requer um ângulo mais obtuso. A técnica de distensão deve produzir uma película de sangue com uma cauda reta, deve ter ao menos 2,5 cm de comprimento e distar ao menos 1 cm do fim da lâmina. Uma distensão no formato da impressão

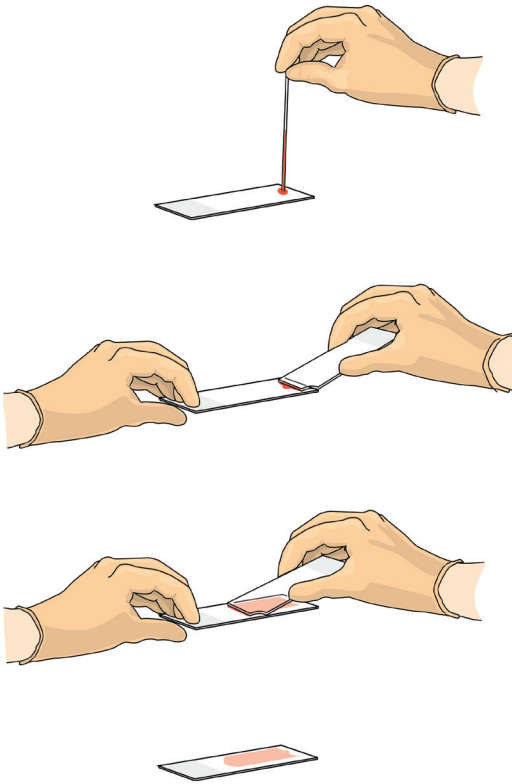


FIGURA 1.9 Método de distensão do sangue.

de um polegar fará o observador mover-se de uma área ótima para identificação de células para outras áreas demasiadamente espessas. É importante limpar a lâmina distensora com um lenço de papel macio e seco, ou com gaze, após cada utilização; caso contrário, poderão ser transferidas células de uma distensão para outra (Figura 1.10).

Imediatamente após o preparo, cada distensão deve ser rotulada com o nome do paciente e a data, ou com um número de identificação. Quando em pequeno número, as lâminas podem ser rotuladas com um marcador de diamante, ou pela escrita a lápis na parte espessa da distensão. O método mais rápido de rotular um grande número de lâminas implica o uso de uma caneta com tinta resistente ao metanol ou a escrita a lápis na extremidade fosca da lâmina. Lâminas opacificadas nas **duas** faces de uma das extremidades são práticas, pois evitam a perda de tempo na escolha da face que deve ser voltada para cima. A secagem das lâminas deve ser rápida; um ventilador, comum ou com ar aquecido, é útil para esse fim. Se as distensões secarem lentamente, haverá contração das células, com aparição de bolhas e vilosidades citoplasmáticas, linfócitos bipolares (fusiformes), núcleos hipercromáticos e desaparecimento dos nucléolos [28]; essas alterações podem ocorrer tanto em células normais como em células neoplásicas, de modo a tornar inaparentes seus aspectos característicos.

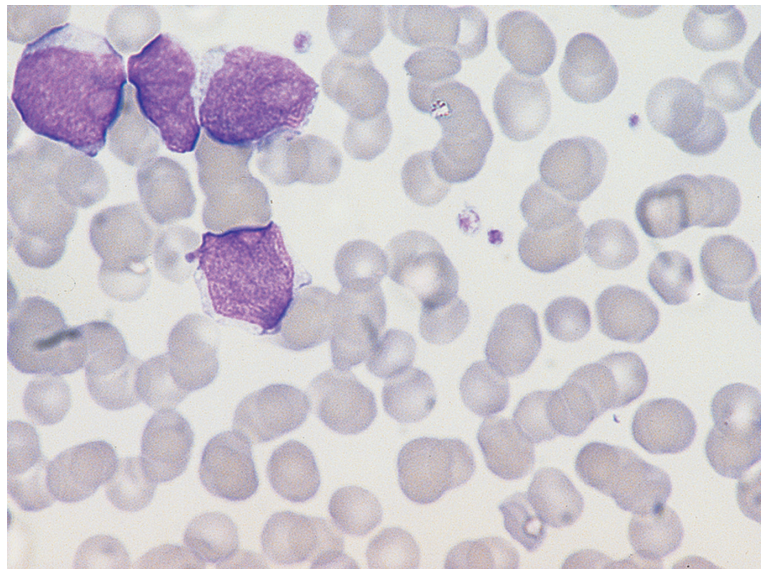


FIGURA 1.10 Células blásticas de um paciente com leucemia aguda inadvertidamente transferidas para a lâmina de outro paciente pelo uso de uma lâmina distensora inadequadamente limpa.

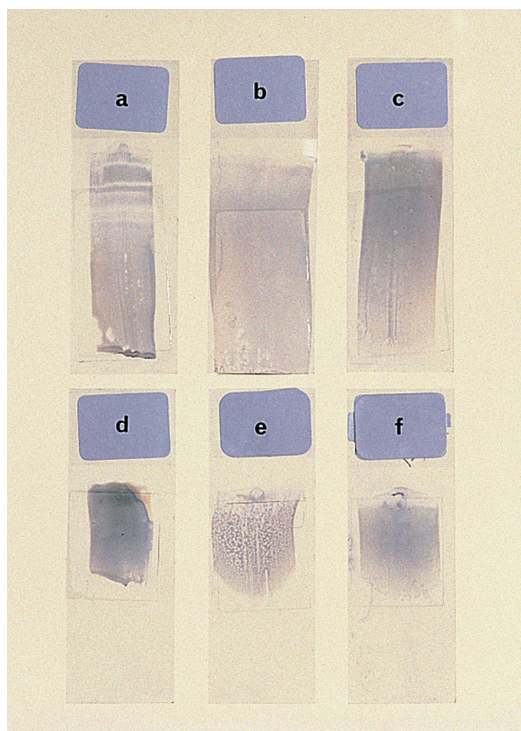


FIGURA 1.11 Distensões sanguíneas satisfatórias e insatisfatórias: (a) a pressão desigual produziu sulcos; (b) muito larga e longa – as margens e a cauda não podem ser examinadas adequadamente; (c) muito longa e riscada por um distensor de superfície irregular; (d) muito espessa e curta, devido à distensão com ângulo ou velocidade errados; (e) a distribuição uniforme das células sanguíneas foi interrompida porque a lâmina estava engordurada; (f) satisfatória.

A Figura 1.11 mostra uma distensão bem-feita, comparada com distensões insatisfatórias por técnica defeituosa.

Exceto especificação em contrário, este livro discute a morfologia observada em distensões preparadas conforme o descrito anteriormente. A maioria das fotografias é de distensões manuais, preparadas com sangue recém-coletado, anticoagulado com EDTA.

Outros métodos de distensão e preparação de lâminas

Distensões automatizadas

Distensões podem ser feitas por equipamentos mecânicos, integrados a máquinas de coloração ou a contadores automatizados. Distensões com a espessura de uma célula podem ser obtidas por centrifugação em um equipamento especial, mas esse método não se difundiu.

Distensões de sangues com Hct muito alto

Se o sangue tiver Hct muito alto, como $Hct > 60\%$ e $Hb > 20 \text{ g/dL}$, pode ser impossível fazer uma boa distensão, mesmo corrigindo-se o ângulo e a velocidade da distensora. A mistura da gota de sangue com uma gota de solução salina, plasma AB ou plasma autólogo reduz a viscosidade e permite uma distensão apropriada à observação da morfologia eritroide.

Distensões da camada de leucócitos

Distensões da camada de leucócitos (*buffy coat*) são úteis por concentrarem as células nucleadas e facilitarem a pesquisa de células anormais de baixa frequência ou de bactérias. O tubo de sangue é centrifugado e uma gota da camada de leucócitos, entre o plasma e a massa eritroide, é misturada com uma gota de plasma autólogo e distendida da forma comum.

Preparação de “gota espessa”

A pesquisa de parasitos da malária e de outros hematozoários requer exame de “gota espessa”, com hemólise antes do exame. Os parasitos ficam mais concentrados, acelerando a pesquisa. A gota espessa é preparada colocando-se no centro da lâmina algumas gotas do sangue, nativo ou anticoagulado, e misturando-as com um palito, de modo a formar um *pool*, de espessura tal que se possa ler através do sangue um texto datilografado ou ver um mostrador de relógio (Figura 1.12). A gota espessa não é fixada; após a secagem, é colocada diretamente na solução aquosa de Giemsa para que haja hemólise, permitindo a visualização mais clara dos parasitos.

Preparações “a fresco”

Preparações úmidas, não coradas (*a fresco*), são úteis para a pesquisa de parasitos móveis, como microfilárias, que podem ser vistas agitando-se entre os eritrócitos. Uma gota de sangue anticoagulado é colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio.

Fixação, coloração e montagem

Fixação

Após secagem ao ar, as distensões são fixadas em metanol absoluto durante 10-20 minutos. É importante não fixar antes do sangue secar completamente. Fixação prematura de uma distensão úmida causa um artefato característico: os conteúdos nucleares

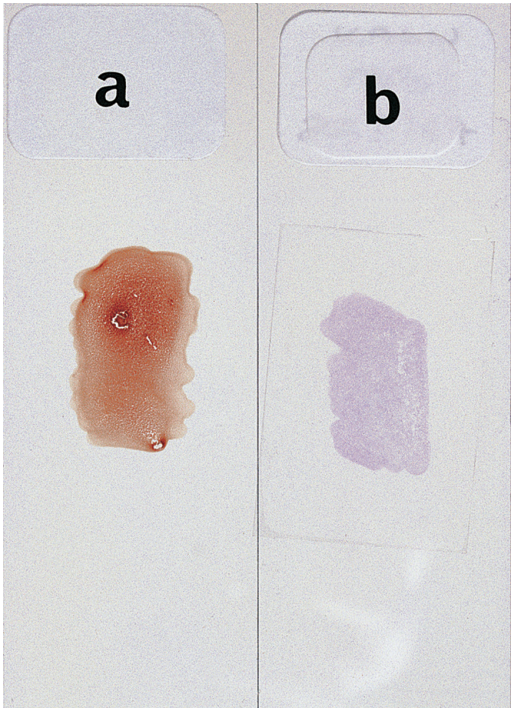


FIGURA 1.12 “Gota espessa” para a pesquisa de parasitos da malária: (a) não corada, mostrando a espessura correta do sangue; (b) distensão corada, sem fixação, causando hemólise.

parecem vaziar para o citoplasma (Figura 1.13). Fixação inadequada, também com alterações artefatuais características, ocorre se houver mais do que mínima porcentagem de água no metanol (Figura 1.14); esta torna impossível a apreciação morfológica da série eritroide; ao exame pouco cuidadoso, tem-se uma falsa impressão de hipocromia. Em climas quentes e úmidos, pode ser necessária a troca do metanol algumas vezes por dia. A condensação nas lâminas produz alterações similares; em climas úmidos, convém fixá-las assim que estiverem completamente secas. Um ventilador aquecido é útil para acelerar a secagem. Em qualquer circunstância, deve ser evitado atraso na fixação, pois isso altera as características da coloração, que passa a mostrar uma tonalidade turquesa.

Coloração

Não há consenso entre os laboratórios quanto à escolha do melhor corante, mas todos os corantes em uso baseiam-se no de Romanowsky, protozoologista russo do fim do século XIX [29]. Trata-se de uma mistura do antigo azul de metileno e de eosina, para corar o núcleo e o citoplasma do

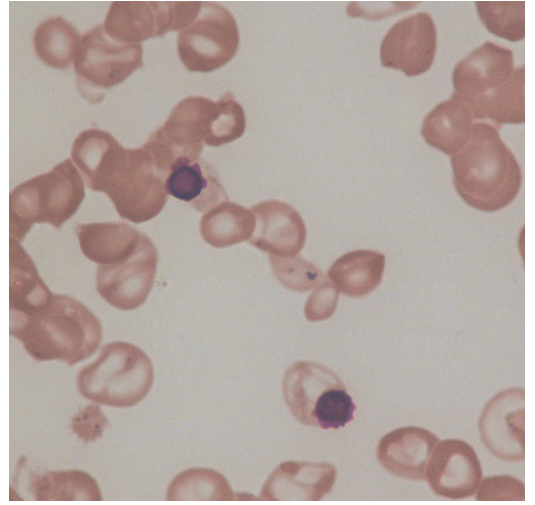


FIGURA 1.13 Distensão sanguínea fixada antes de estar completamente seca. É importante não confundir o vazamento do conteúdo nuclear para o citoplasma, que é artefactual, com diseritropoese.

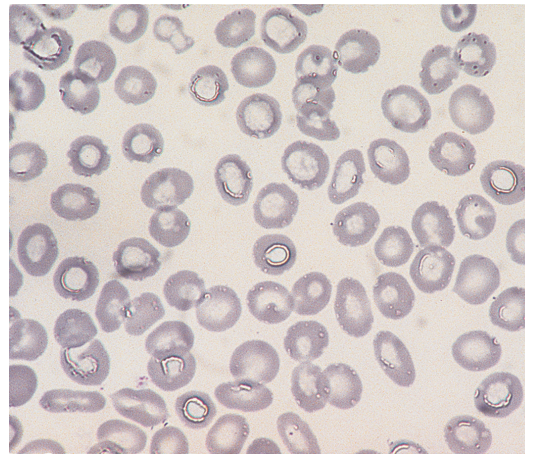


FIGURA 1.14 Alterações artefatuais produzidas pela presença de 5% de água no metanol usado para fixação.

parasito da malária, respectivamente, em púrpura e azul. Subsequentemente, Giemsa modificou o corante, combinando azul e eosina. O corante mais usado no Reino Unido é uma combinação do corante de Giemsa com o de May-Grünwald, denominado May-Grünwald-Giemsa (MGG). Na América do Norte, é o de Wright, que contém azul de metileno policromado – isto é, aquecido de modo a produzir análogos – e eosina. Às vezes, é usada uma combinação deste com o de Giemsa, corante de Wright-Giemsa, que geralmente dá melhores resultados. Demonstrou-se por cromatografia que os

corantes preparados pelos métodos químicos tradicionais não são puros: são vendidos com a mesma denominação, mas contêm mistura variável de 5 a 10 corantes [36]. Há significativa variação, inclusive entre lotes de um mesmo fabricante.

Os componentes essenciais dos corantes de Romanowsky são: (i) um corante básico ou catiônico, como o azure-B, que confere cor azul ou azul-violeta aos ácidos nucleicos (fixa-se aos grupos fosfato do DNA e do RNA), às nucleoproteínas, aos grânulos dos basófilos e, fracamente, aos grânulos dos neutrófilos; e (ii) um corante ácido (aniônico), como a eosina, que confere cor laranja à hemoglobina e aos grânulos dos eosinófilos e, combinando-se com proteínas nucleares, contribui para a cor do núcleo. A combinação azul-B e eosina é um corante de Romanowsky satisfatório [35], da mesma forma que a mistura de azure-B, azul-de-metileno e eosina [36]. O método de referência do ICSH para o corante de Romanowsky [37], que utiliza azure-B puro e eosina-Y, fornece excelentes resultados, mas corantes puros são muito caros para uso rotineiro. Obtém-se uma coloração satisfatória e reprodutível com corantes comerciais de boa qualidade e uma máquina automatizada de coloração. Esse método foi usado para a coloração da maioria das lâminas fotografadas para este livro.

Tradicionalmente, o citoplasma que se cora em azul e os grânulos que se coram em púrpura são ditos *basófilos*, enquanto os grânulos que se coram de violeta ou púrpura-rosado, *azurófilos*. Na verdade, tais tonalidades são obtidas pela tomada de um único corante básico, como o azul-B ou o azul-A. Os termos *acidófilo* e *eosinófilo* referem-se à captação do corante ácido, eosina, embora *acidófilo* seja costumeiramente usado para os componentes celulares que se coram de cor-de-rosa, e *eosinófilo*, para os que se coram de laranja. A Tabela 1.2 mostra a variedade de cores que um corante de Romanowsky deve produzir.

A coloração deve ser feita no pH correto. Quando o pH é muito baixo, os componentes basófilos não se coram de maneira adequada; os leucócitos ficam pálidos, com grânulos eosinófilos de um vermelho-brilhante. Quando o pH é muito alto, há captação excessiva do corante básico, com uma coloração excessiva generalizada; torna-se difícil distinguir a policromatofilia dos eritrócitos, os grânulos dos eosinófilos coram-se em azul-escuro ou cinza e os grânulos dos neutrófilos coram-se de mais, simulando granações tóxicas.

Soluções de corantes podem necessitar de filtração logo antes do uso para evitar depósito de

TABELA 1.2 Coloração característica de diferentes componentes celulares com corante de Romanowsky

Componente celular	Cor
Cromatina (incluindo os corpos de Howell-Jolly)	Púrpura
Grânulos promielocíticos e bastões de Auer	Vermelho-purpúreo
Citoplasma dos linfócitos	Azul
Citoplasma dos monócitos	Azul-acinzentado
Citoplasma rico em RNA (i.e., citoplasma basófilo)	Azul-escuro
Corpos de Döhle	Azul-acinzentado
Grânulos específicos dos neutrófilos, grânulos dos linfócitos, granulômero das plaquetas	Púrpura-claro ou cor-de-rosa
Grânulos específicos dos basófilos	Púrpura-escuro
Grânulos específicos dos eosinófilos	Laranja
Eritrócitos	Cor-de-rosa

corante nas distensões, o qual pode ser confundido com inclusões nos eritrócitos. As máquinas automáticas de coloração com técnica de imersão, em que as lâminas são integralmente mergulhadas no corante, fornecem melhores resultados do que as máquinas que cobrem as lâminas com uma fina camada de corante, em posição horizontal; nestas, há mais probabilidade de haver depósito de corante e, se as distensões forem muito longas ou mal posicionadas, algumas partes podem ficar sem corar.

Distensões coradas com MGG podem ser descoradas; basta cobri-las com álcool metílico, depois lavá-las com água, repetidamente, até o desaparecimento da coloração. O procedimento pode ser útil quando se dispuser de apenas uma lâmina e houver necessidade de outra coloração, por exemplo, coloração de Perls, para ferro.

Coloração para pesquisa de parasitos da malária

A detecção é mais fácil quando as distensões sanguíneas são coradas com Giemsa (ou Leishman), em pH 7,2; os eritrócitos parasitados pelos *Plasmodium vivax* e *ovale* coram-se diferentemente dos eritrócitos não parasitados e são identificados com mais facilidade. As inclusões presentes nas células parasitadas são igualmente bem visíveis (ver Capítulo 3).

Montagem

Quando as lâminas devem ser arquivadas, a montagem protege-as de ranhuras e do acúmulo de pó. Conforme já mencionado, a lamínula deve ser

suficientemente larga para cobrir os bordos da distensão. Usa-se um *mountant* neutro, miscível com xilol.

Como alternativa para a montagem, as lâminas podem ser cobertas com poliestireno ou resina acrílica.

Quando as lâminas não precisam ser arquivadas, podem ser cobertas com uma fina camada de óleo, a fim de permitir exame microscópico em pequeno aumento, antes da adição de gota de óleo para exame com a lente de imersão.

Arquivo de lâminas

O atendimento ideal dos pacientes e a educação continuada da equipe de hematologia exigem que as lâminas de sangue sejam guardadas por longo período – se possível, anos. Lamentavelmente, o número considerável de amostras de sangue que atualmente chega aos grandes laboratórios limita a durabilidade do arquivo. O método mais econômico de arquivar lâminas é dispô-las verticalmente, uma encostada à outra, em gavetas metálicas longas e estreitas. Os rótulos, com nome do paciente, data e número do registro, devem ser colocados de modo a permitir fácil leitura. As lâminas recém-montadas devem ser estocadas em bandejas de papelão, ou dispostas em prateleiras, separadas umas das outras por alças de arame, até que o *mountant* tenha secado e endurecido; nessa ocasião, as lâminas podem ser dispostas encostadas umas às outras por economia de espaço. Lâminas de vidro são pesadas; arquivos muito grandes podem exigir reforço do assoalho da sala.

Lâminas de distensões de medula óssea devem ser arquivadas permanentemente; junto com elas, devem ser arquivadas lâminas do sangue respectivo, para eventual revisão. É necessário que o laboratório mantenha também um arquivo permanente de distensões de sangue para uso didático, incluindo casos de condições raras e exemplos típicos de todas as condições comuns.

Instalação e uso do microscópio

Todo o pessoal técnico deve aprender a lidar com o microscópio desde o começo do treinamento. Um microscópio binocular deve ser instalado e usado como segue.

- 1 Para mover ou levantar o microscópio, segure-o sempre pelo braço (Figura 1.15). Sente-se à bancada do microscópio e certifique-se de que a altura está correta para uma observação

confortável; ajuste a altura da cadeira ou do microscópio na bancada se for necessário.

- 2 Conecte-o à tomada e ligue o interruptor de fornecimento de corrente.
- 3 Ligue a iluminação do microscópio.
- 4 Gire o reóstato até que a intensidade luminosa esteja satisfatória.
- 5 Baixe a platina e gire o revólver de objetivas até posicionar a de aumento 10 ×; ele faz um clique quando chega ao local correto.
- 6 Escolha uma lâmina e coloque-a na platina; cuide para que a distensão esteja para cima. Segure a lâmina pelos bordos. Fixe-a com os retentores próprios.
- 7 Suba o condensador até o término do percurso.
- 8 Abra ao máximo o diafragma de campo e o diafragma-íris do condensador.
- 9 Mova a platina até a distensão posicionar-se sob a objetiva, no trajeto do raio luminoso.
- 10 Suba a platina, olhando a lâmina pelo lado, não pelas oculares, até que a lâmina quase toque a objetiva.
- 11 Ajuste a posição das oculares de modo que correspondam à sua distância interpupilar; olhe pelas oculares, assegurando-se de que a iluminação está com intensidade confortável.
- 12 Baixe a platina com a lâmina, usando o dispositivo de foco macrométrico, até a preparação entrar em foco.
- 13 Usando o foco macrométrico, depois o micrométrico, obtenha o melhor foco possível para a observação com seu olho direito; depois, sem mover a platina, obtenha o melhor foco para o olho esquerdo, usando para isso o anel de ajuste da ocular esquerda. (Há microscópios com anel de foco em ambas as oculares.)
- 14 Feche completamente o diafragma-íris de campo. Ele está próximo à lâmpada e controla a área de iluminação.
- 15 Baixe o condensador até que o bordo do diafragma-íris de campo entre em foco. Confira se a abertura do diafragma-íris de campo está centrada; se não estiver, centralize-a usando os parafusos de centralização no condensador.
- 16 Ajuste o foco movendo o condensador até que os bordos do diafragma apareçam levemente azulados em vez de levemente avermelhados (iluminação de Köhler).
- 17 Abra o diafragma-íris de campo até que todo o campo circular fique iluminado, mas não mais do que isso. Se ele for aberto excessivamente, entrará luz indesejável no campo de visão. (Isso é particularmente, importante para

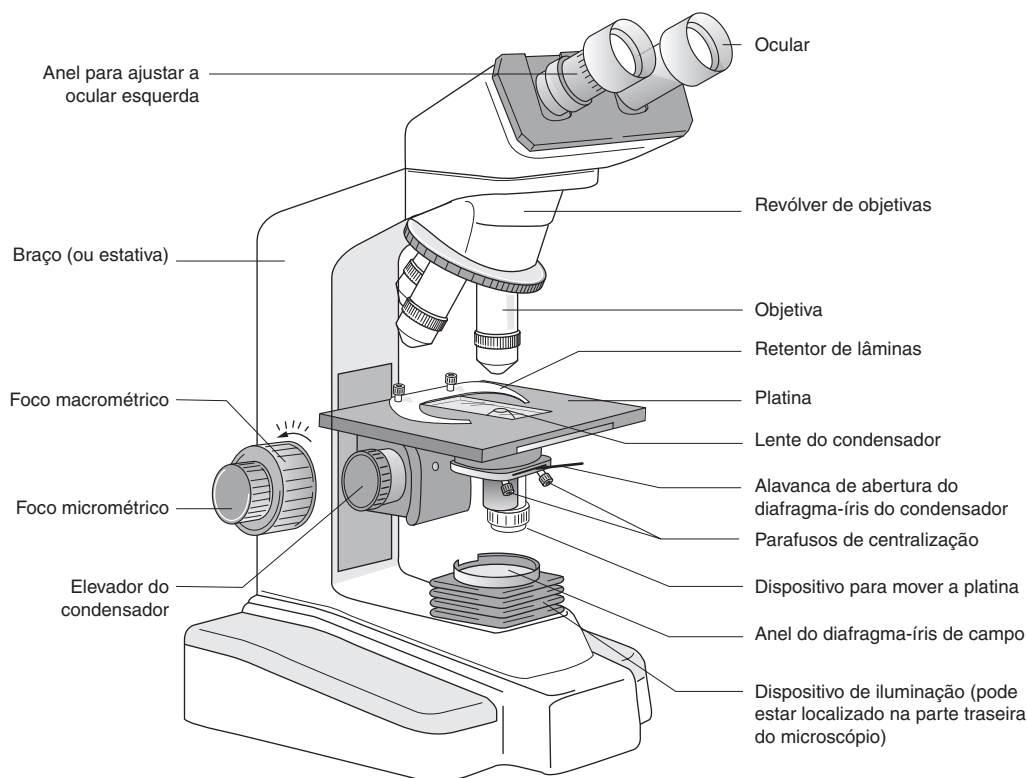


FIGURA 1.15 Desenho de um microscópio mostrando o nome de suas partes componentes.

fotografia; nessa eventualidade, convém até fechar mais o diafragma até que só haja iluminação no contorno a fotografar.)

- 18** Usando a alavanca apropriada (ou anel, em alguns microscópios), feche a abertura do diafragma do condensador até 70 a 80% da abertura numérica (anotada na objetiva em uso). Uma escala no condensador, próxima à alavanca (ou anel) permite tal procedimento. A abertura do diafragma controla a abertura angular do cone de luz que alcança as lentes do condensador; quanto mais fechada esta abertura, menos luz e menor resolução, mas maior contraste e profundidade do foco. Para um foco ótimo, a abertura do condensador deve ser refeita para cada objetiva que entre em uso.
- 19** Examine a lâmina com a objetiva 10 ×*, depois gire para uma objetiva de 40 ×. Reajuste o foco e a abertura do diafragma-íris do condensador

e ajuste o diafragma-íris de campo de modo a iluminar somente o campo de visão. Reexamine a lâmina com esse aumento.

- 20** Antes de usar uma objetiva de imersão, gire para fora a objetiva seca que estava em uso e coloque uma gota de óleo de imersão no centro da lâmina. Gire e posicione a objetiva de imersão, por exemplo, de 60 × ou 100 ×, e foque usando o macro, depois o micrométrico, e reajuste a abertura do condensador. Cuide para não rotar para a preparação outra objetiva, que não a de imersão, quando houver óleo na lâmina; na dúvida, confira a anotação na lateral da objetiva. Não use óleo em excesso e não misture óleos de duas qualidades diferentes. Não encha em excesso o frasco de óleo ou ele irá sujar seus dedos.
- 21** Depois de examinar uma lâmina com uma objetiva de imersão, limpe delicadamente o óleo da objetiva e da lâmina. Se a lâmina tiver sido recentemente montada, remova o óleo com cuidado para não remover a lamínula, e apenas o suficiente para que, se uma lente seca for usada, não seja contaminada com óleo. A remoção de óleo das lâminas não exige papel próprio para lentes;

* Nota: microscópios usados em laboratórios de hematologia geralmente não têm objetivas 4 ×, a não ser que também sejam usados para exames histopatológicos. Se for preciso usar uma objetiva 4 × como para examinar uma biópsia de medula, remova o condensador do sistema girando-o para fora antes de olhar a lâmina.

lenços de papel comuns (*tissues*) são satisfatórios. Lâminas sem montagem não são recomendadas, mas, se forem preferidas e usadas, deve-se tomar cuidado para minimizar os arranhões à distensão durante a remoção do óleo.

- 22 Quando terminar o trabalho, recoloque em posição a objetiva de menor aumento presente no revólver e baixe a platina. Remova traços de óleo das lentes usando metanol e papel para lentes (*lens tissue*). Gire o reóstato ao mínimo antes de desligar a iluminação do microscópio. Nunca deixe o microscópio ligado ao afastar-se do posto de trabalho; em microscópios de baixa qualidade, a lâmpada fica muito próxima do diafragma de campo, e o calor prolongado causa dano às suas folhas.
- 23 Conserve o microscópio limpo. O pó deve ser removido com uma escova pequena. As lentes só devem ser limpas com o papel apropriado; este pode ser umedecido com metanol (ou com mistura de 3 partes de metanol e 7 partes de éter).
- 24 Cubra o microscópio com a capa apropriada quando fora de uso.

Identificação e prevenção de problemas

- 1 Se não houver luz, confira se o feixe luminoso não está voltado para uma câmara.
- 2 Se você não conseguir focar a distensão, confira se a lâmina não foi colocada com a face invertida e, se for montada, veja se não foram colocadas duas lamínulas em vez de uma. Alguns microscópios têm uma parada forçada (*stop*) no macrométrico; libere-o se necessário. Raramente, pode suceder que uma lâmina de vidro excessivamente grossa não permita o foco com objetiva de grande aumento se estiver montada; lamínulas excessivamente espessas causam o mesmo problema.
- 3 Se você não puder ver a imagem com clareza, limpe a lâmina com papel e metanol. Pacotinhos de gaze com metanol, usados na desinfecção da coleta, são convenientes para a limpeza de lâminas; o uso evita a necessidade de ter uma garrafa de metanol na sala de microscopia. Se a limpeza da lâmina não resolver, limpe a objetiva com o papel apropriado e metanol. Não use xilol, salvo se o metanol for insuficiente para a limpeza da lente.
- 4 Se você usar óculos, notará ser impossível trabalhar ao microscópio com lentes bifocais ou multifocais. As lentes plásticas modernas de óculos arranham-se facilmente, em especial se tiverem uma cobertura antirreflexiva.

Certifique-se de que as oculares têm uma guarda de borracha se quiser trabalhar de óculos com esses tipos de lentes.

Exame de uma distensão de sangue

- 1 Confira o rótulo da lâmina (identidade do paciente e data).
- 2 Examine a distensão macroscopicamente para características anormais.
- 3 Ajuste o microscópio como recém-descrito e examine microscopicamente, percorrendo os bordos, a cauda e depois toda a distensão, com pequeno aumento (objetiva 10 ×).
- 4 Depois examine toda a distensão com uma objetiva 40 × ou 50 ×. É a parte mais importante do exame; é possível examinar a distensão quase completamente para notar alguma rara célula anormal. Seja sistemático: olhe especificamente os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas.
- 5 Faça a contagem diferencial de leucócitos, se indicada.
- 6 Examine com a objetiva de imersão só se houver uma razão particular para isso.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências bibliográficas

- 1 Roddy SM, Ashwal S and Schneider S (1983) Venipuncture fits: a form of reflex anoxic seizure. *Pediatrics*, **72**, 715–717.
- 2 Ahlgrim C, Pottgiesser T, Robinson N, Sottas PE, Ruecker G and Schumacher YO (2010) Are 10 min of seating enough to guarantee stable haemoglobin and haematocrit readings for the athlete's biological passport? *Int J Lab Haematol*, **32**, 506–511.
- 3 Sander HWE, Conigliari MF and Masdeu JC (1998) Antecubital phlebotomy complicated by lateral antebrachial cutaneous neuropathy. *N Engl J Med*, **339**, 2024.
- 4 Golder M, Chan CL, O'Shea S, Corbett K, Chrystie IL and French G (2000) Potential risk of cross-infection during peripheral-venous access by contamination of tourniquets. *Lancet*, **355**, 44.
- 5 Mull JD and Murphy WR (1993) Effects of tourniquet-induced stasis on blood determinations. *Am J Clin Pathol*, **39**, 134–136.
- 6 Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M and Guidi GC (2006) Venous stasis and routine hematologic testing. *Clin Lab Haematol*, **28**, 332–337.

- 7 Ohnishi H, Watanabe M and Watanabe T (2012) Butterfly needles reduce the incidence of nerve injury during phlebotomy. *Arch Pathol Lab Med*, **136**, 352.
- 8 NCCLS. H3-A4 – Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standard, 4th edn. NCCLS, Wayne, PA, 1998.
- 9 Hammond KB (1980) Blood specimen collection from infants by skin puncture. *Lab Med*, **11**, 9–12.
- 10 Anonymous (1999) Glass capillary tubes: joint safety advisory about potential risks. *Lab Med*, **30**, 299.
- 11 Polish LB, Shapiro CN, Bauer F, Klotz P, Ginier P, Roberto RR *et al.* (1992) Nosocomial transmission of hepatitis B virus associated with the use of a spring-loaded finger-stick device. *N Engl J Med*, **326**, 721–725.
- 12 Vertanen H, Laipio ML, Fellman V, Brommels M and Viinikka L (2000) Hemolysis in skin puncture samples obtained by using two different sampling devices from preterm infants. Paper presented at 24th World Congress of Medical Technology, Vancouver, Canada.
- 13 Vertanen H, Fellman V, Brommels M and Viinikka L (2000) An automatic incision device causes less damages to the heels of preterm infants. Paper presented at 24th World Congress of Medical Technology, Vancouver, Canada.
- 14 Brecher G, Schneiderman M and Cronkite EP (1953) The reproducibility and constancy of the platelet count. *Am J Clin Pathol*, **23**, 15–26.
- 15 Conway AM, Hinchliffe RF and Anderson LM (1998) Measurement of haemoglobin using single drop of skin puncture blood: is precision acceptable? *J Clin Pathol*, **51**, 248–250.
- 16 Forestier F, Hohlfeld P, Vial Y, Olin V, Andreux J-P and Tissot J-D (1996) Blood smears and prenatal diagnosis. *Br J Haematol*, **95**, 278–280.
- 17 ICSH Expert Panel on Cytometry (1993) Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *Am J Clin Pathol*, **100**, 371–372.
- 18 NCCLS. M29-A – Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue: approved guideline. NCCLS, Wayne, PA, 1997.
- 19 Masuko K, Mitsui T, Iwano K, Yamazaki C, Aikara S, Baba K *et al.* (1985) Factors influencing postexposure immunoprophylaxis of hepatitis B viral infection with hepatitis B immune globulin. High deoxyribonucleic acid polymerase activity in the inocula of unsuccessful cases. *Gastroenterology*, **88**, 151–155.
- 20 Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, Alter HJ, Dietz AA, Felsher BF *et al.* (1978) Type B hepatitis after needle-stick exposure: prevention with hepatitis B immune globulin. A final report of the Veterans Administration Cooperative study. *Ann Intern Med*, **88**, 285–293.
- 21 Ramsay ME (1999) Guidance on the investigation and management of occupational exposure to hepatitis C. *Commun Dis and Public Health*, **4**, 258–262.
- 22 Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F *et al.* (1992) Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*, **126**, 1109–1114.
- 23 Heptonstall J, Gill ON, Porter K, Black MB and Gilbert VL (1993) Health care workers and HIV: surveillance of occupationally acquired infection in the United Kingdom. *Commun Disease Rep*, **3**, 147–153.
- 24 Bending MR and Maurice PD (1980) Malaria: a laboratory risk. *Postgrad Med J*, **56**, 344–345.
- 25 Glaser JB and Garden A (1985) Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, **312**, 266.
- 26 Kramer F, Sasse SA, Simms JC and Leedom JM (1993) Primary cutaneous tuberculosis after a needlestick injury from a patient with AIDS and undiagnosed tuberculosis. *Ann Intern Med*, **119**, 594–595.
- 27 Advisory Committee on Dangerous Pathogens. *Management and control of viral haemorrhagic fevers*. The Stationery Office, London, 1996.
- 28 De Wazières B, Gil H, Vuitton DA and Dupond JL (1998) Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury. *Lancet*, **351**, 498.
- 29 Katz MH and Gerberding JL (1997) Postexposure treatment of people exposed to the human immunodeficiency virus through sexual contact or injection drug use. *N Engl J Med*, **336**, 1097–1100.
- 30 Gottlieb S (2001) Nevirapine should not be prescribed for needlestick injuries. *BMJ*, **322**, 126.
- 31 Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Sanantonio T, Mayer J, Zankel M *et al.* (2001) Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med*, **345**, 1452–1457.
- 32 Ashenden M, Clarke A, Sharpe K, d’Onofrio G, Allbon G and Gore CJ (2012) Preanalytical mixing of whole-blood specimens in the context of the Athlete Passport. *J Clin Pathol*, **65**, 8–13.
- 33 The International Consensus Group for Haematology Review (2005) Suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Haematol*, **11**, 83–90.
- 34 Nguyen D and Diamond L. *Diagnostic hematology: a pattern approach*. Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000.
- 35 Wittekind D (1979) On the nature of the Romanowsky dyes and the Romanowsky–Giemsa effect. *Clin Lab Haematol*, **1**, 247–262.
- 36 Marshall PN, Bentley SA and Lewis SM (1975) A standardized Romanowsky stain prepared from purified dyes. *J Clin Pathol*, **28**, 920–923.
- 37 ICSH (1984) ICSH reference method for staining blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). *Br J Haematol*, **57**, 707–710.

CAPÍTULO 2

Técnicas de contagem de glóbulos

No passado, as contagens de glóbulos e as demais determinações do hemograma eram feitas por técnicas manuais, lentas e trabalhosas, empregando câmaras de contagens, pipetas diluidoras, microscópios, tubos graduados ou capilares, centrifugadores, colorímetros e um pequeno número de reagentes simples, sendo a dosagem de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Hct) e a contagem de leucócitos (L) as determinações mais usadas. A Hb era medida por método baseado em densidade óptica, com o resultado inicialmente expresso em porcentagem relativa a um “100% normal” arbitrário, modificado depois para a expressão atual massa/volume. O Hct, medida da fração ocupada pelos eritrócitos em uma coluna de sangue centrifugado, pode ser expresso como uma porcentagem ou como uma fração decimal (volume/volume) do total centrifugado.* Os leucócitos eram contados ao microscópio, com o sangue apropriadamente diluído em uma câmara de volume conhecido, o hemocitômetro. Todas as contagens de células eram, e persistem sendo, expressas em número de células por uma unidade de volume.** A contagem de eritrócitos era feita só ocasionalmente, e em geral para permitir uma estimativa do tamanho dos eritrócitos, correlacionando-a ao Hct. As plaquetas eram contadas por microscopia óptica ou de contraste de fases, mas apenas quando havia óbvia necessidade clínica. Das determinações primárias relativas à série vermelha, eram derivados outros valores: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM). As fórmulas eram as seguintes:

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Hct (\%)} \times 10}{\text{E} (\times 10^6/\mu\text{L})} \quad \text{OU}$$

$$\frac{\text{Hct (vol/vol)} \times 1.000}{\text{E} (\times 10^6/\mu\text{L})}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 10}{\text{E} (\times 10^6/\mu\text{L})}$$

$$\text{CHCM (g/dL ou \%)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\text{Hct (\%)}} \quad \text{OU}$$

$$\frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Hct (vol/vol)}} \quad \text{OU} \quad \frac{\text{HCM}}{\text{VCM}}$$

Hoje, essas e outras determinações são realizadas em minutos, em instrumentos automatizados ou semiautomatizados, com modificações das técnicas manuais ou com tecnologia completamente nova. As determinações são reprodutíveis (precisas), isto é, repetições com a mesma amostra dão resultados praticamente iguais. Se os instrumentos estiverem cuidadosamente calibrados com padrões confiáveis e o sangue não tiver características incomuns, as determinações também são exatas (acuradas), ou seja, os resultados aproximam-se muito dos valores verdadeiros. Porém, apesar do uso generalizado de instrumentos automatizados, continuam úteis as técnicas manuais, tanto como métodos de referência quanto na investigação de amostras de sangue de resultados anômalos nos instrumentos automatizados. Servem também para lembrar os princípios nos quais se baseiam as diferentes determinações.

Técnicas básicas

Dosagem de hemoglobina (Hb)

Para a dosagem de Hb, adiciona-se um volume predeterminado de sangue total, cuidadosamente homogeneizado, a um diluente que lisa os eritrócitos pela hipotonicidade e pela presença de um detergente lítico não iônico, produzindo uma solução de hemoglobina. A dosagem então é feita medindo-se a densidade óptica (ou absorvância) da solução de hemoglobina ou de seus derivados, em comprimento de onda selecionado.

*N. de T. No Brasil (e nesta tradução) a expressão do Hct em porcentagem é a preferida (Ex.: Hct = 45,0%), ao contrário da usada no original inglês (Hct = 0,45); a preferência justifica-se porque é a usada nos resultados de todos os contadores eletrônicos e estes expressam-no em três dígitos (um decimal), ao passo que o Hct em fração é expresso com apenas dois dígitos válidos. As contagens de células nesta tradução serão sempre expressas “por microlitro de sangue” (μL), como se usa no Brasil. Na contagem de eritrócitos “ $\times 10^6$ ” representará “milhões”, na de leucócitos, “ $\times 10^3$ ” representará milhares. A sigla RBC (Red Blood Cells) será traduzida por E (inicial de Eritrócitos), por exemplo, $\text{E} = 5,0 \times 10^6/\mu\text{L}$. Leucócitos (WBC) não terão abreviação ou símbolo nesta tradução, por exemplo, Leucócitos = $6,5 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Método da cianometemoglobina

O International Committee (agora Council) for Standardization in Haematology (ICSH) recomenda um método de referência no qual a hemoglobina é convertida em cianometemoglobina (hemiglobincianeto) [1]. Esse método apresenta três importantes vantagens:

- 1 A hemoglobina, a metemoglobina e a carboxiemoglobina são convertidas em cianometemoglobina, de modo que todas são incluídas na dosagem. Das formas de hemoglobina que podem estar presentes no sangue, apenas a sulfemoglobina – geralmente em quantidades desprezíveis – não é convertida em cianometemoglobina, embora a carboxiemoglobina seja convertida mais lentamente do que as demais.
- 2 São facilmente obtidos, para calibração, padrões secundários estáveis, previamente comparados com o padrão internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) [2].
- 3 A cianometemoglobina tem uma faixa de absorvância em 540 nm, ampla e relativamente plana (Figura 2.1), podendo-se, assim, ler a densidade óptica tanto na faixa estreita de um espectrofotômetro quanto em um fotômetro (colorímetro), com filtro adequado, que lê uma faixa mais ampla de comprimentos de onda.

O método de referência exige a adição de um diluente que contenha: (i) cianeto e ferrocianeto de potássio, para a conversão em metemoglobina; (ii) fosfato de potássio di-hidrogenado, para baixar o pH, acelerar a reação e permitir a leitura da absorvância óptica em 3 minutos e não em 10 a 15 minutos; e (iii) um detergente não iônico, para acelerar a hemólise e reduzir a turvação devida à precipitação das lipoproteínas (e, em menor grau, do estroma dos eritrócitos), que é consequência da baixa do pH provocada pelo fosfato monopotássico [2].

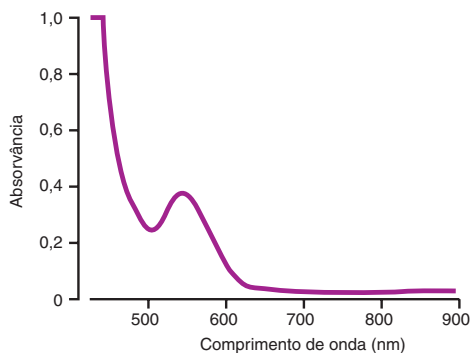


FIGURA 2.1 Espectro de absorvância da cianometemoglobina.

A absorvância da luz pela solução é determinada em 540 nm, em espectrofotômetro. Nesse comprimento de onda, a absorvância do diluente é zero, podendo-se empregar, como branco, água ou o próprio diluente. Teoricamente, não é necessário um padrão, pois é possível calcular a concentração da hemoglobina a partir da absorvância, visto serem conhecidos o peso molecular e o coeficiente de extinção milimolar da hemoglobina. No entanto, como se deve conferir o comprimento de onda da luz produzida pelo instrumento e a escala de absorvância, costuma-se calibrar com uma solução de referência de cianometemoglobina.

No passado, a Hb era rotineiramente dosada utilizando-se um fotômetro ou colorímetro que produz luz de comprimento de onda de aproximadamente 540 nm pelo uso de um filtro amarelo-verde Ilford 625. A luz, que atravessava a solução, era detectada pela célula fotoelétrica, e a escala do instrumento apresentava-a como absorvância de luz ou transmitância. A comparação da leitura do instrumento com a da solução de referência permitia calcular a Hb, o que era feito de forma mais conveniente com uma curva-padrão ou com uma tabela de conversão. Também se podia calibrar a escala do fotômetro para a leitura direta da Hb. É indispensável uma solução de referência de cianometemoglobina para verificar a exatidão nesse tipo de instrumento.

Alterações patológicas das amostras de sangue podem prejudicar a dosagem da Hb pela cianometemoglobina. A presença de sulfemoglobina causa discreta subestimativa da hemoglobina total: uma concentração de 15 g/dL será medida como 14,8 g/dL se 5% da hemoglobina estiverem sob a forma de sulfemoglobina [3]. A conversão lenta da carboxiemoglobina em metemoglobina leva a uma superestimativa da Hb se o teste for lido em 3 minutos, pois a carboxiemoglobina absorve mais luz em 540 nm do que a cianometemoglobina. O erro máximo, que pode acontecer se 20% da hemoglobina estiverem sob a forma de carboxiemoglobina, o que pode ocorrer em fumantes compulsivos, será de 6% [3].

Os espectrofotômetros e os fotômetros são sensíveis ao efeito da turvação, que pode ser provocada por contagem elevada de leucócitos, altas concentrações de lipídios ou de proteínas plasmáticas ou presença de eritrócitos não lisados. O aumento da turvação provoca elevação espúria da taxa de Hb. Quando a contagem de leucócitos for muito alta, o efeito da turvação pode ser corrigido por centrifugação ou filtração da solução antes da leitura da absorvância. Quando a turvação for devida à taxa elevada de proteínas plasmáticas (presença de

paraproteína ou hipergamaglobulinemia policlonal por infecção ou inflamação crônica severas), ela pode ser eliminada pela adição de carbonato de potássio ou de uma gota de solução de amônia a 25%. Quando for decorrente de hiperlipidemia, pode-se preparar um branco do diluente com o plasma do paciente ou remover o lipídio pela extração com dietil-éter e centrifugação. Há possibilidade de não ocorrer lise no diluente de células em alvo de hepatopatias ou de eritrócitos contendo hemoglobina S ou C, e, mais uma vez, o aumento da turvação produzirá aumento espúrio da leitura da Hb; esse fenômeno é algumas vezes observado sem haver anormalidade causal identificável nos eritrócitos. Uma diluição 1:1 em água destilada garante a lise completa das células osmoticamente resistentes.

O método da cianometemoglobina foi modificado para ser aplicado em instrumentos automatizados, utilizando-se diversos agentes líticos e leitura da absorvância em menor tempo ou em diferente comprimento de onda.

Outros métodos

Quase não são utilizados outros métodos para a dosagem de Hb, a menos que tenham sido incorporados a hemoglobínometros. Tais métodos geralmente exigem aferição por padrões de cianometemoglobina, mas, por outro lado, evitam o uso do cianeto, potencialmente tóxico quando liberado em quantidade significativa no ambiente.

A hemoglobina pode ser convertida em um derivado sulfatado, com absorvância máxima em 534 nm, pela adição de sulfato lauril-sódico [4]. A conversão é instantânea, com conversão da metemoglobina, mas não da sulfemoglobina. O método apresenta boa correlação com o método de referência, empregado na calibração. Pode ser usado com um espectrofotômetro, e foi preferido e incorporado a vários instrumentos automatizados.

Também é possível dosar a Hb após a conversão em azidmetemoglobina pela adição de nitrato de sódio e de azida sódica. É o método utilizado por um hemoglobínometro portátil (HemoCue, Clandon Scientific Ltd.), que faz medidas em dois comprimentos de onda, 570 e 880 nm, para permitir a compensação da turvação. Uma modificação desse instrumento permite medidas acuradas até de 0,01 g/dL de Hb, de modo que se presta para dosar a Hb em soluções muito diluídas, como fluido coletado à cirurgia, plasma ou urina [5].

Pode-se dosar a Hb como oxiemoglobina; neste caso, as concentrações de carboxiemoglobina, sulfemoglobina e metemoglobina não são dosadas com

exatidão. Torna-se necessário um padrão artificial ou secundário. Esse método foi incorporado aos hemoglobínometros de leitura direta, padronizados para fornecer o mesmo resultado do método da cianometemoglobina.

A Hb pode ser medida como hematina produzida em meio alcalino. O método hematina-alcaldina dosa a carboxiemoglobina, a sulfemoglobina e a metemoglobina, mas não dosa adequadamente a hemoglobina F e a hemoglobina de Bart, resistentes à desnaturação alcalina. É necessário um padrão artificial. A dosagem como hematina ácida não é recomendável.

Pode-se dosar a Hb sem conversão química pela determinação de sua absorvância em 548,5 nm, comprimento de onda no qual a desoxiemoglobina e a oxiemoglobina apresentam a mesma densidade óptica, e a da carboxiemoglobina não fica muito abaixo. A Hb é calculada por comparação de absorvância com a de um padrão artificial. Similarmente, podem ser integradas as absorvâncias entre 500 e 600 nm, pois, nessa ampla faixa de onda, as absorvâncias totais da oxiemoglobina, da desoxiemoglobina e da carboxiemoglobina tornam-se similares.

Novos métodos para a dosagem da Hb foram introduzidos para testes junto ao paciente (ver adiante).

Unidades recomendadas

O ICSH recomenda que a Hb seja expressa em massa por volume (g/L ou g/dL) ou em mmol/L (concentração molar), relacionada ao monômero de hemoglobina. O fator de conversão é 0,06206, ou seja, uma Hb de 120 g/L = $120 \times 0,06206$ mmol/L = 7,45 mmol/L. Quando se expressa a Hb em concentração molar, também devem ser expressas assim a HCM e a CHCM. Uma HCM de 27 pg é equivalente a 1,70 fmol, e uma CHCM de 330 g/L (33 g/dL), a 20 mmol/L. Evidentemente, não há vantagem prática em expressar a Hb em concentração molar; apenas causa confusão, com risco para os pacientes. Laboratórios na grande maioria dos países preferem a familiaridade à correção teórica e continuam a expressar a Hb em massa por volume. Nesta tradução, foi preferida a expressão da Hb em g/dL como se usa no Brasil.

Hematócrito (Hct)

É a fração ocupada pelos eritrócitos em uma coluna de sangue centrifugado; uma pequena parte desse volume corresponde a plasma retido entre as células. O Hct é expresso como fração decimal (volume/volume; a unidade é inútil, já que está acima e abaixo do quociente) relativa à coluna total, ou como porcentagem – preferida no Brasil. A expressão *packed cell volume* (PCV) – volume das células compactadas

– foi sempre empregada em inglês como sinônimo de Hct, mas a ICHS recomenda agora que PCV designe as determinações feitas pelas técnicas tradicionais de centrifugação e hematócrito (Hct) designe as estimativas obtidas por outros métodos, nos instrumentos automatizados.* O método original de determinação do Hct, tal como foi planejado por Maxwell Wintrobe, requeria 1 mL de sangue e uma centrifugação de 30 a 60 minutos, em tubos grandes de vidro, com um diâmetro interno constante. Esse método, agora chamado de macro-hematócrito, foi o método de referência [6], mas por ser lento e trabalhoso caiu em desuso e não será mais discutido. Ele foi substituído pelo micro-hematócrito – por si só de utilidade clínica –, que pode ser combinado com a Hb para se obter uma estimativa da CHCM, e usado para calibrar os contadores automatizados.

Micro-hematócrito (micro-Hct)

Aspira-se, por capilaridade, um pequeno volume de sangue em tubo capilar não graduado (geralmente com 75 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno) deixando vazios cerca de 15 mm. Sela-se a extremidade distante da coluna de sangue, pelo calor ou com massa de modelar. Centrifuga-se por 5 a 10 minutos em alta rotação (entre 10.000 e 15.000 *g*) em um centrifugador pequeno, especialmente projetado para essa determinação. A coluna de sangue separa-se em eritrócitos e plasma, com uma pequena camada de leucócitos e plaquetas na interface (*buffy coat*) (Figura 2.2). O Hct é lido visualmente, em escala apropriada, excluindo-se da leitura a camada de leucócitos e plaquetas.

O ICHS publicou um método que preconiza uma centrifugação de 5 minutos [7]. Se o sangue mostrar poliglobulia, é recomendada uma centrifugação adicional de 3 minutos para diminuir a retenção de plasma na coluna [8]. O micro-Hct costuma ser determinado em sangue venoso anticoagulado com EDTA, mas também pode ser usado sangue capilar coletado em tubo de micro-Hct com interior revestido de heparina (2 iu). Tubos plásticos (poli-carbonato), mais seguros do que os de vidro, estão comercialmente disponíveis.

O micro-Hct pode ser medido junto ao paciente, em um instrumento automático que associa uma centrífuga a um analisador infravermelho [9].

Note-se que há risco na execução do micro-Hct. Os tubos capilares podem quebrar na hora de selar a

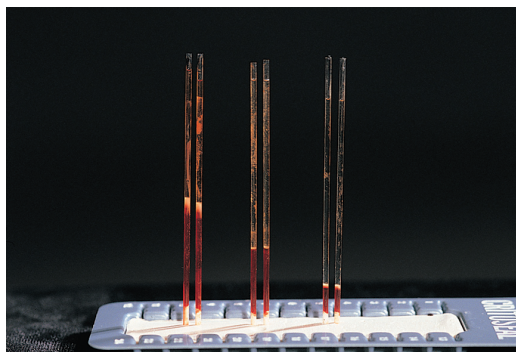


FIGURA 2.2 Determinações do micro-hematócrito; são mostrados testes pareados de três pacientes.

extremidade e causar lesões penetrantes, com inoculação de sangue no operador. Há um caso comprovado de contágio de HIV por esse acidente, e o técnico subsequentemente desenvolveu aids [10, 11]. Os tubos também podem quebrar na centrífuga, com risco de ferimentos e transmissão viral [11].

Há várias causas de falta de exatidão e reprodutibilidade no micro-Hct. Em decorrência das pequenas dimensões do tubo, a leitura correta é difícil. Os tubos podem ser algo afunilados ou não ter diâmetro constante. O selo na extremidade não é plano, mas convexo, quando se emprega massa, e côncavo, quando se fecha pelo calor, mas o erro causado pelo tipo de seladura é insignificante [12]. A quantidade de plasma retida na coluna de eritrócitos é da ordem de 1 a 3% do valor da leitura, mas pode variar. É menor quanto maior for o período de centrifugação e o valor de *g*, mas também pode ser afetado por outros fatores técnicos e pelas características da amostra de sangue (Tabela 2.1). É importante observar que nos Estados Unidos e no Brasil o sangue é geralmente colhido em K₃EDTA e, no Reino Unido, em K₂EDTA; devido à retração celular que ocorre com K₃EDTA, o micro-Hct é cerca de 2% (do valor da leitura, não pontos percentuais) inferior ao obtido com K₂EDTA [17]. Pode-se aumentar a precisão do micro-Hct fazendo-se três determinações na mesma amostra e tirando-se a média; isso é necessário quando o micro-Hct é feito com a finalidade de calibração de um instrumento automatizado; nesse caso, recomenda-se, também, oxigenar bem o sangue antes de encher os tubos capilares, porque a desoxigenação aumenta o resultado [16].

Retenção de plasma na coluna

Houve tentativas no sentido de aumentar a exatidão do micro-Hct, corrigindo-se o resultado pela subtração do volume de plasma retido, o que tornaria também mais exatas as estimativas do VCM e da CHCM.

*N. de T. No Brasil, como somente o termo “hematócrito” foi e é usado, ele será adotado como tradução para PCV e Hct, sem distinção; os raros laboratórios que utilizavam “volume globular” como sinônimo de Hct deixaram de fazê-lo, já que causava confusão com “volume corpuscular (ou globular) médio” (VCM).

TABELA 2.1 Alguns fatores que afetam o micro-hematócrito

	Fatores que reduzem o micro-hematócrito	Fatores que aumentam o micro-hematócrito
Em consequência da diluição	Uso de solução de EDTA em vez de EDTA seco (0,5 menor)	
Em consequência de alteração na quantidade de plasma retido	Maior período de centrifugação	Menor período de centrifugação
	Maior força centrífuga (p. ex., maior raio da centrífuga ou maior velocidade de centrifugação)	Redução da força centrífuga
	VSG elevada	Microcitose (p. ex., deficiência de ferro ou traço talassêmico)
Em consequência de retração dos eritrócitos		Traço ou anemia de células falciformes
		Esferocitose
		Redução da flexibilidade dos eritrócitos devido à prolongada armazenagem à temperatura ambiente
	Excesso de EDTA [13,14]	
	Uso de K ₂ EDTA em vez de K ₂ EDTA ou Na ₂ EDTA [12] (cerca de 2% menor)	K ₂ EDTA ou Na ₂ EDTA
	Tubos mais estreitos do que o recomendado [15]	
	Tubo de vidro de soda e potassa [15]	Tubos de borossilicato
	Sangue completamente oxigenado [16]	Sangue desoxigenado [16]

VSG, velocidade de sedimentação globular.

Em condições experimentais, isso pode ser feito marcando-se proteínas plasmáticas com ¹³¹I e determinando-se a quantidade de isótopo radiativo retido na coluna de eritrócitos. Entretanto, tal correção também não é exata, visto que se obtêm estimativas menores da retenção de plasma quando se emprega o fibrinogênio marcado com ¹³¹I do que quando se usa a albumina marcada com ¹³¹I [12]. Diferentes estudos produziram estimativas da retenção média de plasma que variam de 1,3 a 3,2%. Usar ou não usar uma correção para a retenção de plasma quando se preparam calibradores para instrumentos automáticos influencia os valores de referência para VCM, Hct e CHCM. O método de referência do Comitê de Citometria do ICSH leva em consideração o efeito da retenção de plasma [18] (ver adiante). Uma circunstância em que a correção da retenção é considerada apropriada é a do uso do micro-Hct na estimativa da volemia eritroide total no diagnóstico de policitemia. Deve ser considerada a maior retenção de plasma no micro-Hct do sangue policitêmico. Admite-se que para Hct < 0,50 após centrifugação por 5 minutos deva-se aplicar correção de 2%; com Hct > 0,50, centrifugar mais 5 minutos e aplicar correção de 3% [19].

Método de referência proposto

O método proposto pelo ICSH para o Hct [18] baseia-se na determinação da Hb no sangue total e na massa de eritrócitos compactados pela centrifugação em uma centrífuga de micro-Hct. A dosagem é feita em células compactadas obtidas do meio da coluna, onde a retenção de plasma é mínima,

produzindo assim uma dosagem que não inclui plasma retido. O Hct de referência é:

$$\frac{\text{Hb no sangue total}}{\text{Hb nos eritrócitos compactados}}$$

Em sangue com Hct normal, um micro-Hct convencional difere menos de 0,01 do Hct de referência.

Foi proposto um método de referência alternativo, usando um micro-Hct feito em tubos capilares de borossilicato [20]. O método fornece um resultado livre do efeito do plasma retido.

Outros métodos

Com o uso atual de instrumentos automatizados, computa-se o Hct a partir do número e do tamanho dos impulsos elétricos gerados pela passagem dos eritrócitos por um sensor (ver adiante).

Contagem de eritrócitos (E)

No passado, os eritrócitos eram contados à microscopia de uma amostra de sangue cuidadosamente diluída, em uma câmara de volume conhecido (hemocitômetro) [21]. Embora produzisse resultados satisfatórios quando realizado com extremo cuidado, esse método demonstrou-se inadequado à rotina pelo alto grau de imprecisão e por consumir excessivo tempo de trabalho. Por isso, a contagem de eritrócitos e os parâmetros dela derivados eram solicitados apenas para poucos casos selecionados.

Podem-se realizar contagens de eritrócitos mais precisas e, portanto, de maior utilidade clínica, em contadores de impedância semiautomatizados de canal único, como o Contador Coulter modelo ZM, que faz a contagem em um volume fixo e conhecido

do sangue diluído, quando as células passam por uma abertura. Uma vez estabelecido o conjunto exato de limiares, esses instrumentos não precisam de calibração. As contagens de células fornecidas pelo instrumento não variam linearmente com a concentração celular, pois seu aumento amplia a chance de passarem duas células simultaneamente pela abertura (coincidência); alguns instrumentos fazem a correção automática dessa coincidência; caso contrário, ela deve ser feita pelo usuário, com uma tabela apropriada. Os leucócitos são também incluídos na contagem; como os eritrócitos são, como regra, pelo menos 100 vezes mais numerosos do que os leucócitos, a inexatidão por essa razão não costuma ser grande. Contagens de eritrócitos realizadas em contadores de impedância de canal único são muito mais precisas do que as feitas em câmaras de contagem, além de demandarem muito menos trabalho. Podem ser utilizadas com Hb e Hct manuais para cálculo do VCM e da HCM, os quais também serão muito mais reproduzíveis do que os derivados das contagens de eritrócitos ao microscópio.

Contagens de eritrócitos realizadas por contadores de impedância semiautomatizados de canal único podem ser usadas para calibrar os contadores totalmente automatizados, os quais contam os impulsos elétricos gerados pela passagem dos eritrócitos por um sensor. A contagem por instrumentos automatizados é da ordem de 20.000 a 50.000 células, de modo que a reprodutibilidade é, outra vez, muito superior à feita no hemocitômetro, com base em 500 a 1.000 células.

O método de referência para contagem de eritrócitos emprega um método semiautomático de impedância de um canal, com acurada correção da coincidência pela extrapolação de contagens em diluições seriadas [22].

Parâmetros eritroides derivados: índices hematimétricos

Com a dosagem de hemoglobina, a determinação do hematócrito e a contagem de eritrócitos, é possível calcular o VCM, a HCM e a CHCM. Quando não for utilizada a correção da retenção de plasma, o VCM derivado do micro-Hct será uma superestimativa do verdadeiro valor, e a CHCM, uma subestimativa. Isso não tem consequências, pois os valores de referência serão derivados da mesma maneira. Os parâmetros medidos pela máquina e os derivados, que descrevem as características dos eritrócitos, são designados coletivamente como índices hematimétricos.

Contagem de leucócitos (L)

No passado, os leucócitos eram contados à microscopia de uma alíquota de sangue, diluída em solução

que lisava os eritrócitos e corava o núcleo dos leucócitos [21], no mesmo hemocitômetro usado para a contagem de eritrócitos. Na câmara de contagem, os eritroblastos (eritrócitos nucleados) são difíceis de distinguir dos leucócitos; se houver eritroblastos, deve-se determinar sua porcentagem em uma suspensão corada, corrigindo-se, por seu intermédio, a contagem total de células nucleadas. A contagem de leucócitos no hemocitômetro é imprecisa, mas isso tem menor importância prática do que a imprecisão da contagem de eritrócitos, pois as alterações clinicamente relevantes da contagem de leucócitos costumam ser de suficiente magnitude para detecção mesmo com um método impreciso.

Leucócitos também podem ser contados no sangue total diluído em solução hemolítica nos contadores de impedância semiautomatizados de canal único. Nos contadores totalmente automatizados, os leucócitos são contados pela tecnologia de impedância ou de dispersão de luz. Os contadores automáticos, na maioria, são inadequados para contar números muito baixos de leucócitos – por exemplo, para garantir que as unidades de derivados sanguíneos para transfusão tenham menos de 5 milhões (5×10^6) leucócitos. Para esse fim, há necessidade de exame em citômetro de fluxo, corando-se os núcleos dos leucócitos com corante para DNA [23].

O método de referência para a contagem de leucócitos usa um instrumento semiautomático, de um só canal de impedância, com correção da coincidência feita pela extrapolação a partir de resultados de contagens em diluições seriadas [22]. O limiar inferior é ajustado entre o ruído produzido pelos estromas de eritrócitos e os sinais dos leucócitos.

Contagem de plaquetas

As plaquetas podem ser contadas em hemocitômetro, ao microscópio, em sangue total diluído (com eritrócitos intactos ou lisados) ou em plasma rico em plaquetas (preparado por sedimentação ou centrifugação). Se houver plaquetas excepcionalmente grandes, prefere-se o método do sangue total ao plasma rico em plaquetas, pois, sendo grandes e pesadas, há risco de perdê-las nos procedimentos de preparação. Prefere-se a contagem no plasma rico em plaquetas nos casos de baixas contagens. Quando o método deixa as plaquetas intactas, podem-se distinguir as plaquetas grandes dos eritrócitos pequenos pelo formato, mais oval do que redondo, e pelo contorno irregular, sendo visíveis, às vezes, finas projeções. O uso de oxalato de amônio (que lisa os eritrócitos) como diluente ocasiona uma contagem mais alta e mais exata do que o formol-citrato, que deixa os eritrócitos intactos [24]. Contagens

de plaquetas devem ser feitas preferencialmente em sangue venoso anticoagulado, obtido por uma punção venosa limpa; contagens feitas em sangue obtido por picada digital tendem a ser mais baixas porque sempre há perda de plaquetas por adesão ao endotélio dos vasos lesados e agregação.

As plaquetas podem ser vistas na câmara de contagem com microscópio óptico ou com contraste de fase. Quando se usa o microscópio óptico, é vantajoso acrescentar azul-brilhante-de-cresil ao diluente: as plaquetas coram-se em azul-claro, o que facilita a identificação. Na microscopia óptica, a refratibilidade ajuda a identificar as plaquetas. No microscópio de contraste de fase, é mais fácil identificá-las, e se obtêm contagens mais precisas.

Em geral, as contagens de plaquetas no hemocítmetro são imprecisas, particularmente quando baixas. São também muito trabalhosas, e, quando essa for a única técnica disponível, deve ser empregada somente em casos de definida indicação clínica.

As plaquetas podem ser contadas com métodos semiautomatizados nos contadores de impedância, depois de preparação de plasma rico em plaquetas. Há a necessidade da correção de coincidência e do uso de dois limiares, para excluir tanto restos celulares como contaminação por eritrócitos e leucócitos. Tais técnicas são também trabalhosas, e os diversos passos necessários para a sua realização aumentam a possibilidade de erro.

Laboratórios com equipamento automático para contagem de eritrócitos, mas não de plaquetas, podem estimá-las indiretamente, calculando a relação eritrócitos/plaquetas em uma distensão corada.

A única maneira satisfatória de contar plaquetas, com a frequência exigida pela prática médica atual, é com contadores totalmente automatizados, com contagem por tecnologia de impedância, de dispersão de luz ou de fluorescência óptica. Em refinamento mais recente, pode ser incorporado um anticorpo monoclonal a uma glicoproteína das plaquetas, de modo a distingui-las com segurança de outras partículas. As contagens costumam ser reprodutíveis mesmo quando há trombocitopenia, mas características incomuns da amostra sanguínea podem produzir inexatidão (ver Capítulo 4). Em alguns pacientes com plaquetas gigantes, que não podem ser distinguidas dos eritrócitos na maioria dos contadores automáticos, ainda é necessário fazer as contagens no hemocítmetro ou pela correlação com a contagem de eritrócitos à microscopia.

Há várias propostas para um método de referência. Uma delas correlaciona as plaquetas aos eritrócitos, em um instrumento automático capaz de distinguir com precisão entre ambos, usando a contagem

de referência de eritrócitos para o cálculo do número de plaquetas. Em outro método, as plaquetas são contadas em um citômetro de fluxo, após marcação com um anticorpo monoclonal fluorescente, como o CD41, o CD42a ou o CD61, que se liga especificamente às plaquetas. Utiliza-se como calibrante um número conhecido de micropérolas fluorescentes, ou calcula-se a contagem relacionando o número de plaquetas fluorescentes ao número de eritrócitos, determinado por método de referência [25-27]. Este último procedimento é o atual método de referência da ICSH [28], pois erros de diluição, por acometerem igualmente as plaquetas e o termo de comparação, não interferem no resultado; usa-se uma mistura de anticorpos marcados anti-CD41 e CD61. Note-se que, se houver um defeito genético nas plaquetas, com falta de uma das glicoproteínas da membrana, um anticorpo monoclonal pode não se ligar a elas, por isso o uso de dois anticorpos. Uma técnica similar, por citometria de fluxo, tem sido recomendada para contagens de plaquetas de rotina em pacientes severamente trombocitopênicos quando uma contagem for decisiva quanto à indicação, ou não, de transfusões de plaquetas [29].

Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial dos leucócitos (ou fórmula leucocitária) é a especificação de suas categorias expressa em porcentagem ou, quando se dispuser da contagem de leucócitos, como contagem absoluta. O ICSH preconiza a expressão sempre em números absolutos [30]. A contagem diferencial feita por um observador ao microscópio é dita “fórmula leucocitária manual”. Em geral, é feita em distensão preparada manualmente ou em máquina automática. Atualmente, a grande maioria das contagens diferenciais é feita em equipamento automático, por citometria de fluxo, como parte do hemograma, com a diferenciação em categorias sendo baseada em características físicas e/ou bioquímicas das células. Dependendo do contador automático utilizado, a contagem de leucócitos pode incluir também os eritroblastos, nesse caso sendo uma *contagem total de células nucleadas* (CTCN), ou identificar e excluir os eritroblastos, ou contá-los separadamente; neste, é uma verdadeira contagem de leucócitos.

Os leucócitos normalmente presentes no sangue periférico podem ser classificados em cinco ou seis categorias, conforme forem separados ou não os neutrófilos segmentados dos não segmentados ou bastonados (ver Capítulo 3). A fórmula leucocitária também inclui as células anormais presentes. Os eritroblastos podem ser incluídos como uma das categorias da fórmula, ou, alternativamente, anotados

fora desta, com seu número relativo a 100 leucócitos. Neste último caso, a contagem total, subtraída do número de eritroblastos, converte-se em contagem de leucócitos. No primeiro caso, a contagem não corrigida (CTCN) é usada para o cálculo dos valores absolutos de cada tipo celular. Os laboratórios devem ater-se rigorosamente a apenas uma dessas convenções ao expressar os resultados de contagens. É provavelmente melhor **não** corrigir a CTCN para contagem de leucócitos, calcular os valores absolutos a partir da CTCN e da porcentagem de cada tipo celular, assim como incluir os eritroblastos na fórmula diferencial. Esta política parece preferível porque a CTCN costuma ser uma medida precisa, feita pela máquina eletrônica, enquanto a relação do número de eritroblastos para 100 leucócitos, obtida à microscopia, é imprecisa; é melhor não substituir uma medida precisa da CTCN por uma estimativa imprecisa da contagem de leucócitos. Entretanto, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda expressar os eritroblastos por 100 leucócitos [31]. Esse problema é evitado pelos contadores eletrônicos mais recentes que identificam com segurança os eritroblastos e excluem-nos automaticamente das contagens de leucócitos.

A fórmula leucocitária, assim como todos os exames de laboratório, está sujeita à falta de precisão e de exatidão. Erros podem ser de natureza estatística, de distribuição ou de interpretação. Fórmulas leucocitárias manuais costumam ser satisfatoriamente exatas (acuradas), mas são sempre imprecisas, isto é, pouco reprodutíveis. Fórmulas automáticas, por outro lado, são muito precisas (reprodutíveis), mas às vezes inexatas.

Inexatidão

Na contagem diferencial manual (ao microscópio), a inexatidão, isto é, a diferença da contagem verdadeira, decorre tanto da má distribuição na distensão quanto de erros de identificação das células.

Má distribuição das células

Os diferentes tipos de leucócitos não se distribuem uniformemente sobre a lâmina. A extremidade da distensão contém mais neutrófilos do que linfócitos, enquanto os monócitos são distribuídos uniformemente em todo o comprimento [32]. Quando há grandes células imaturas (blastos, promielócitos e mielócitos), elas se acumulam mais nos bordos da distensão do que na parte central, e mais distalmente em relação aos linfócitos, basófilos, neutrófilos e metamielócitos [33]. Essa má distribuição agrava-se quando a distensão for fina demais ou quando

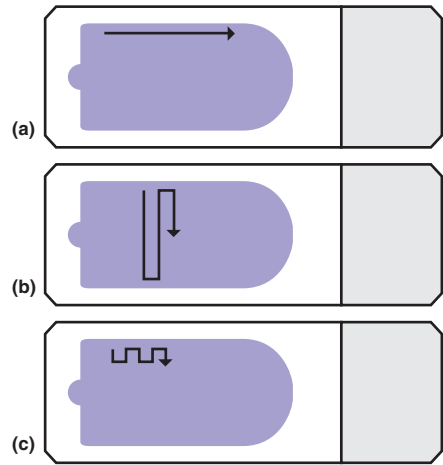


FIGURA 2.3 Diagramas do modo de percorrer as distensões de sangue para a contagem diferencial de leucócitos: (a) ao longo da distensão; (b) método em ameia; e (c) método em ameia modificado – são contados dois campos perto e paralelos à borda da distensão, depois quatro campos em ângulo reto e dois campos paralelos ao bordo, e assim por diante.

se utilizar uma lâmina distensora de bordo irregular. Foram propostos vários métodos de exame da lâmina para superar os erros devidos à má distribuição (Figura 2.3). O método apresentado na Figura 2.3a compensa a má distribuição entre o corpo e a extremidade, mas não entre o centro e o bordo, enquanto o método “em ameia”, apresentado na Figura 2.3b, tende a fazer o inverso, pois, nesse caso, a contagem diferencial de 100 células não cobrirá uma parte significativa do comprimento da distensão. O rastreamento em ameia modificado (Figura 2.3c) é um meio-termo entre os dois métodos. Na prática, a falta de reprodutibilidade da contagem ao microscópio é tão grande que um pequeno grau de inexatidão, provocado pela má distribuição das células, não tem maiores consequências. Se ocorrer agregação de leucócitos, a má distribuição será tão grande a ponto de impossibilitar uma contagem diferencial exata.

Erros na identificação e células de identificação impossível

A inexatidão decorrente de erros na identificação das células em geral não é grande quando as contagens diferenciais são feitas por técnicos experientes em distensões sanguíneas de boa qualidade. A diferenciação dos neutrófilos em bastonados e segmentados faz exceção. Os critérios diferenciais variam entre os laboratórios, havendo inconsistência na aplicação desses critérios até dentro de um mesmo laboratório, pelo alto componente de subjetividade. Às vezes, também é difícil distinguir um monócito de um grande

linfócito ou um basófilo degranulado de um neutrófilo. Artefatos originados da conservação do sangue tornam a contagem diferencial ainda mais inexata; neutrófilos em degeneração podem ser classificados incorretamente como eritroblastos e a desintegração preferencial dos neutrófilos pode provocar uma elevação espúria da porcentagem de linfócitos. A presença de muitas células amassadas pode gerar inexatidão se estas não forem incluídas na fórmula (ver p. 136). Se as células amassadas forem, por exemplo, linfócitos, a porcentagem e o número absoluto destes ficarão falsamente baixos e os de todas as outras células, falsamente altos. Células amassadas cuja natureza ainda possa ser determinada devem ser contadas com a categoria à qual pertencem. Células de natureza impossível de indentificar devem ser contadas como uma categoria separada, ou a porcentagem e o número absoluto das células de todas as demais categorias serão falsamente aumentados. Na leucemia linfocítica crônica (LLC), é possível reduzir o número de células amassadas (*smear celles ou basket cells*) pela adição de 1 gota de albumina para 4 gotas de sangue antes de fazer a distensão.

Falta de reprodutibilidade

A imprecisão, ou falta de reprodutibilidade, de uma contagem expressa-se pelo desvio-padrão (DP) ou pelo coeficiente de variação (CV) de uma série de determinações feitas na mesma amostra. O pequeno número de células contado ao microscópio na fórmula leucocitária causa baixa reprodutibilidade dos resultados [34]. Quando são feitas determinações múltiplas da porcentagem de um tipo celular distribuído a esmo entre outros, o DP relaciona-se à raiz quadrada da porcentagem encontrada. Especificamente, o DP da porcentagem de um tipo celular escolhido, θ , é igual a [35]:

$$\sqrt{\frac{\theta(1-\theta)}{n}}$$

Os limites de confiança de 95% dos valores percentuais da fórmula, ou seja, os limites dentro dos quais se espera que caiam 95% das contagens replicadas, são iguais a $\theta \pm 1,96$ DP. Os limites de confiança para várias porcentagens de células, quando forem contadas 100 ou mais, são apresentados na Tabela 2.2; pode-se notar que são muito amplos. Por exemplo, os limites de confiança de uma contagem de eosinófilos de 10%, em uma contagem diferencial de 100 células, são de 4 a 18%. A reprodutibilidade da contagem absoluta de determinada contagem de células não pode ser melhor do que a precisão da porcentagem, mas, quando calculada a partir de uma contagem de leucócitos automatizada, que é uma medida

TABELA 2.2 Limites de confiança de 95% da porcentagem observada de células quando o número total de células contadas (n) varia de 100 a 10.000*

Porcentagem de células observadas	Número total de células contadas (n)				
	100	200	500	1.000	10.000
0	0-4	0-2	0-1	0-1	0,0-0,04
1	0-6	0-4	0-3	0-2	0,8-1,2
2	0-8	0-6	0-4	1-4	1,7-2,3
3	0-9	1-7	1-5	2-5	2,7-3,3
4	1-10	1-8	2-7	2-6	3,6-4,4
5	1-12	2-10	3-8	3-7	4,6-5,4
6	2-13	3-11	4-9	4-8	5,5-6,5
7	2-14	3-12	4-10	5-9	6,5-7,5
8	3-16	4-13	5-11	6-10	7,4-8,6
9	4-17	5-15	6-12	7-11	8,4-9,6
10	4-18	6-16	7-14	8-13	9,4-10,6
15	8-24	10-21	12-19	12-18	14,6-15,4
20	12-30	14-27	16-24	17-23	19,6-20,4
25	16-35	19-32	21-30	22-28	24,6-25,4
30	21-40	23-37	26-35	27-33	29,5-30,5
35	25-46	28-43	30-40	32-39	34,5-35,5
40	30-51	33-48	35-45	36-44	39,5-40,5
45	35-56	38-53	40-50	41-49	44,5-45,5
50	39-61	42-58	45-55	46-54	49,5-50,5

*As variações de n = 100 a n = 1.000 são derivadas da referência 34.

muito precisa, não será muito pior. A falta de reprodutibilidade da contagem diferencial ao microscópio é maior nas células em menor número, particularmente nos basófilos. Se for importante para o diagnóstico saber se há ou não basofilia, é necessário aumentar a precisão contando mais do que as habituais 100 células (p. ex., 200 ou 500 células). Da mesma forma, se os neutrófilos constituírem apenas uma pequena porcentagem de células (p. ex., na leucemia linfocítica crônica), uma vez mais é necessário contar um maior número de células, para aumentar a reprodutibilidade e constatar se há ou não neutropenia. Embora seja possível melhorar a precisão da contagem ao microscópio, contando-se mais células, em um laboratório clínico é inviável contar, de rotina, mais de 100 ou, no máximo, 200 células. A pouca precisão da contagem de células em baixo número significa que os limites de referência inferiores das contagens de basófilos e eosinófilos incluem o zero e é, portanto, impossível, com base em uma contagem ao microscópio, dizer se um paciente tem basopenia ou eosinopenia. Deve-se reconhecer, também, que a reprodutibilidade da contagem de neutrófilos bastonados é tão baixa que em geral é inútil contá-los e anotá-los separadamente dos segmentados; basta um comentário “desvio à esquerda” ou “aumento dos bastonados”, quando se notar um aumento óbvio.

O CSLI estabeleceu um método de referência para a contagem diferencial [31]. Usa-se uma distensão manual, corada com coloração

de Romanowsky; dois técnicos experientes contam, cada um, 200 células, correndo a lâmina “em ameia” (ver Figura 2.3b). O resultado é a média da contagem diferencial dessas 400 células.

Contagem de reticulócitos

Reticulócitos são eritrócitos jovens, recém-liberados pela medula óssea e que ainda contêm RNA ribossômico. Pela exposição das células não fixadas a certos corantes, como o azul-brilhante-de-cresil ou o novo-azul-de-metileno, os ribossomos são precipitados e corados, aparecendo como um retículo; como as células ainda estavam vivas quando foram expostas ao corante, essa coloração é chamada de supravital. Com novo-azul-de-metileno, os eritrócitos coram-se em azul esverdeado claro, aparecendo o retículo em púrpura-azulado.

A quantidade de retículo varia de um grande grumo nos reticulócitos mais imaturos (reticulócitos do grupo I) a uns poucos grânulos nos mais maduros (reticulócitos do grupo IV) (Figura 2.4). A dificuldade para determinar se somente um ou dois pontos de material corado realmente representam RNA levou à proposição de diversas definições de reticulócito. As exigências mínimas variam de um único ponto, um mínimo de dois ou três pontos, ou o necessário para formar uma pequena rede. Como a maioria dos reticulócitos do sangue periférico pertence ao grupo IV, a definição precisa escolhida terá um efeito apreciável sobre a contagem de reticulócitos. O NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, agora CLSI) classifica como reticulócito “qualquer eritrócito não nucleado contendo duas ou mais partículas de material corado

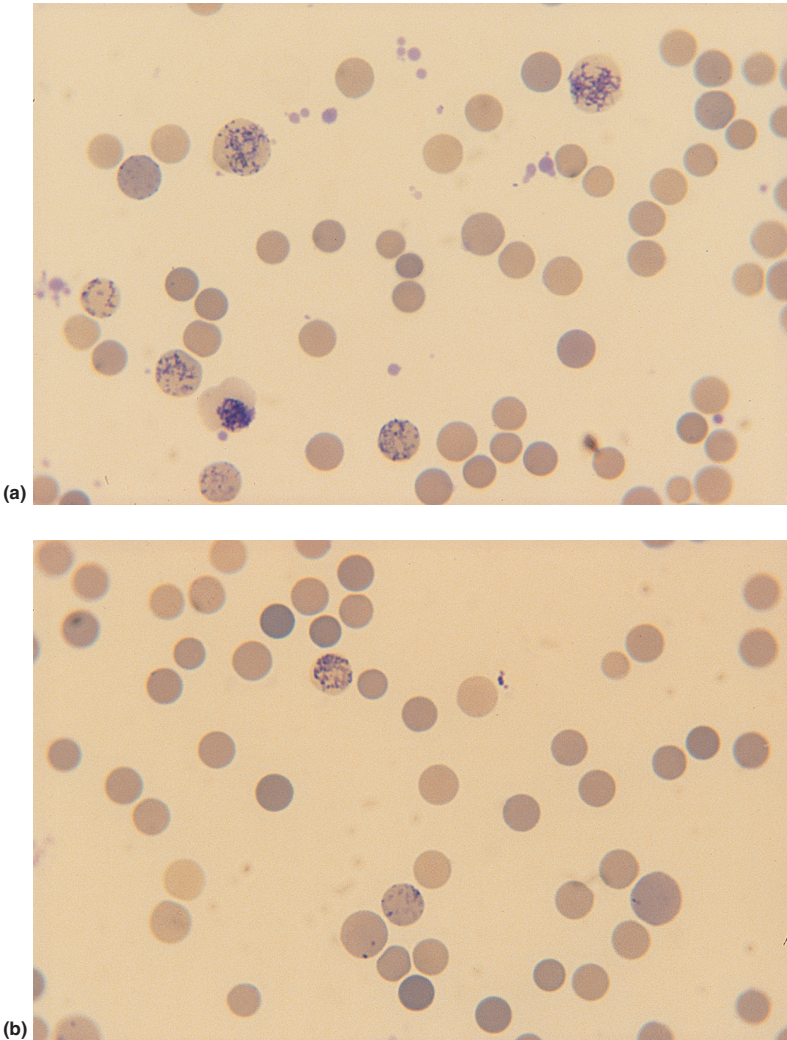


FIGURA 2.4 Reticulócitos corados com novo-azul-de-metileno. (a) Um reticulócito do grupo I com um denso grumo de retículo, vários reticulócitos do grupo II com uma coroa ou rede de retículo e vários reticulócitos do grupo III com uma coroa desintegrada de retículo. (b) Reticulócitos dos grupos II, III e IV: o reticulócito do grupo IV apresenta dois grânulos de retículo. Também há uma célula com um único ponto de retículo: por alguns critérios, também pode ser classificada como reticulócito. (Continua)

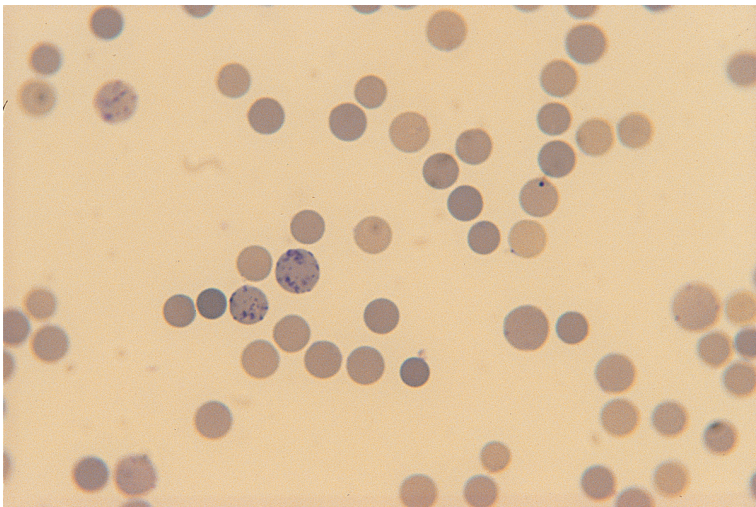


FIGURA 2.4 Continuação (c) Três reticulócitos e um corpo de Howell-Jolly.

em azul, correspondendo a RNA ribossômico” [36]. Essa definição também é aceita pelo ICSH [37].

O RNA responsável pela formação do retículo à coloração supravital, nas distensões coradas com um corante de Romanowsky, ocasiona uma basofilia citoplasmática difusa. A combinação da basofilia citoplasmática com a acidofilia da hemoglobina produz características de coloração conhecidas por policromatofilia (policromatocitose ou policromasia). Nem todos os reticulócitos contêm RNA suficiente para produzir policromatocitose na distensão corada com Romanowsky, mas não se tem certeza se as células policromáticas correspondem apenas aos reticulócitos menos maduros (do grupo I) [38] ou a todos, exceto os mais maduros (reticulócitos dos grupos I, II e III) [39].

Há outras inclusões que podem ser confundidas com o retículo dos reticulócitos – métodos para distingui-las estão na Tabela 2.3 –, as quais são discutidas em detalhes no Capítulo 7. Em particular,

células que contêm corpos de Pappenheimer podem ser difíceis de distinguir dos reticulócitos tardios, com apenas poucos grânulos de material reticulofilamentoso. Quando necessário, pode-se contraporar uma preparação de reticulócitos com a coloração de Perls, para identificar corpos de Pappenheimer, ou com colorações de Romanowsky, para identificar corpos de Howell-Jolly. Quando se fixa uma preparação de reticulócitos com metanol e se contracora com a coloração de Romanowsky, a coloração vital, ou seja, o novo-azul-de-metileno, é lavada durante a fixação em metanol. O retículo cora-se, então, pelo componente básico do corante de Romanowsky [40].

Geralmente contam-se os reticulócitos como porcentagem dos eritrócitos. O uso na ocular do microscópio de um micrômetro ocular, o graticulo de Miller (Figura 2.5), facilita e torna mais precisa a contagem. Os reticulócitos são contados, em cada campo, no quadrado grande, e o total de eritrócitos

TABELA 2.3 Aparência de várias inclusões eritrocitárias em uma preparação de reticulócitos com novo-azul-de-metileno

Nome	Natureza	Aparência
Retículo	RNA ribossômico	Material reticulofilamentoso ou poucos grânulos pequenos
Corpos de Pappenheimer	Inclusões contendo ferro	Um ou mais grânulos na periferia da célula, que podem se corar em um azul mais profundo do que o retículo
Corpos de Heinz	Hemoglobina desnaturada	Maiores do que os corpos de Pappenheimer, de forma irregular, geralmente presos à membrana celular, podendo fazer protrusão por intermédio dela; azul-pálida
Corpos de Howell-Jolly	DNA	Maiores do que os corpos de Pappenheimer, de forma regular, distantes da membrana celular; azul-pálida
Inclusões de hemoglobina H	Hemoglobina H desnaturada	Geralmente não se formam em curtos períodos de incubação; quando presentes, são múltiplas e esféricas, com aparência de “bola de golfe”; azul-esverdeada-pálida

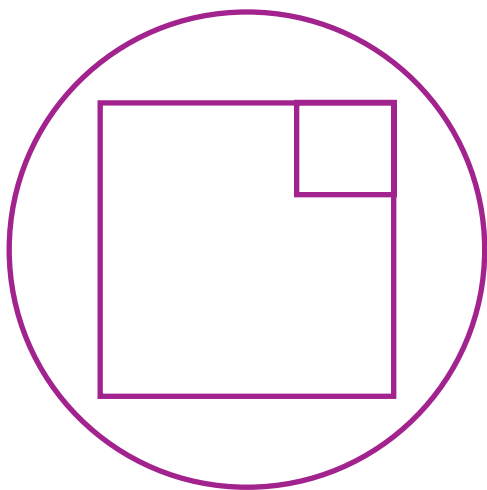


FIGURA 2.5 Aparência do micrômetro ocular de Miller, para a contagem de reticulócitos.

no quadrado pequeno, que tem um nono do tamanho do quadrado grande. Contando-se 20 campos, são contados os reticulócitos entre cerca de 2 mil eritrócitos, sendo a porcentagem de reticulócitos igual a:

$$\frac{\text{Reticulócitos em 20 quadrados grandes} \times 100}{\text{Eritrócitos em 20 quadrados pequenos} \times 9}$$

A contagem feita com o micrômetro de Miller é muito mais precisa [41]. Devem ser contados campos consecutivos e não campos ao acaso, senão tende-se a preferir, subconscientemente, aqueles com mais reticulócitos [41]. É essencial, também, que sejam contados os eritrócitos que tocam dois lados escolhidos do quadrado, e não contados os que tocam os outros dois lados; a falta desse cuidado produz um *bias* para menos na contagem de reticulócitos com o uso do disco de Miller [42]. O número de células que deve ser contado, para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade, é maior quanto menor for a porcentagem de reticulócitos. A Tabela 2.4 lista o número de células que devem ser contadas para obter-se um CV de aproximadamente 10% usando-se um graticulo de Miller [37].

As contagens de reticulócitos têm sido tradicionalmente expressas em porcentagem. Dispondo-se da contagem de eritrócitos, pode-se calcular o número absoluto de reticulócitos, o qual exprime com mais exatidão a produção de eritrócitos da medula óssea. Como alternativa, é possível obter-se um resultado mais significativo do que a porcentagem, corrigindo-se para o grau de anemia, da seguinte maneira:

TABELA 2.4 Número de células a contar no quadrado pequeno do graticulo de Miller para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade na contagem de reticulócitos*

Contagem de reticulócitos (%)	Número aproximado de eritrócitos a contar nos quadrados pequenos para um CV de 10%	Equivalente à contagem total de
1-2	1.000	9.000
3-5	500	4.500
6-10	200	1.800
20-25	100	900

*Da referência 37.
CV, coeficiente de variação.

$$\text{Índice reticulocitário} = \frac{\text{Porcentagem de reticulócitos} \times \text{Hct do paciente}}{\text{Hct normal}}$$

Por exemplo,

$$\text{Índice reticulocitário} = \frac{1,2 \times 29}{45} = 0,77$$

Esse exemplo mostra que uma contagem de reticulócitos aparentemente normal pode ser anormalmente baixa para a anemia presente. Tal procedimento e a contagem absoluta de reticulócitos fornecem informações semelhantes. Pode-se fazer uma correção mais complexa [43], levando em consideração o fato de que, em indivíduos anêmicos, devido ao aumento de eritropoetina, os reticulócitos são liberados prematuramente da medula óssea e permanecem mais tempo no sangue, antes de transformarem-se em eritrócitos maduros. Nessa circunstância, o índice reticulocitário e a contagem absoluta de reticulócitos criam uma impressão um tanto falsa da produção da medula óssea. Calcula-se um “índice de produção de reticulócitos” [43] dividindo-se o índice reticulocitário pelo tempo médio de maturação do reticulócito no sangue periférico, no grau respectivo de anemia. Ainda que os índices reticulocitário e de produção não tenham uma aceitação geral, deve-se ter em mente os conceitos neles contidos quando se interpretam contagens de reticulócitos.

Embora prefira-se, como indicador da produção da medula óssea, a contagem absoluta de reticulócitos ou um dos índices reticulocitários, a porcentagem de reticulócitos tem a vantagem de fornecer uma indicação da sobrevida periférica dos eritrócitos. Se um paciente com anemia hemolítica estável apresentar uma contagem de reticulócitos de 10%, é evidente que 1 célula em 10 tem menos de 1 a 3 dias de idade.

A contagem de reticulócitos é estável com a conservação do sangue anticoagulado com EDTA por até 24 horas à temperatura ambiente [44] e por vários dias a 4°C [37].

O método de referência para a contagem de reticulócitos do CLSI baseia-se em técnica com coloração por novo azul de metileno; o azure-B é aceito como corante alternativo [45].

Unidades e abreviações aprovadas

O ICSH recomendou abreviações padronizadas para os parâmetros do sangue periférico. Elas são mostradas, com as unidades recomendadas – do Sistema Internacional (SI) –, suas abreviações e símbolos, na Tabela 2.5.

Análise automatizada de imagem

Contadores automatizados diferenciais por reconhecimento de padrão

A CellaVision AB (Lund, Suécia) produziu contadores automatizados que fazem fórmula diferencial por reconhecimento de padrão (*pattern-recognition*): o Diffmaster Octavia e seu sucessor, o CellaVision DM96, baseados nos aspectos celulares à microscopia de distensões coradas com May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou Wright-Giemsa. A interpretação é feita com um programa de computador empregando *neural networks** [46, 47]. A análise de cada lâmina demora cerca de 5 minutos no Octavia e 3 minutos no CellaVision DM96. A identificação de células pode ser confirmada visualmente e, se necessário, alterada. As imagens são de alta qualidade (Figura 2.6) e podem ser arquivadas e usadas para revisão ou ensino. O DM96 foi considerado mais rápido na execução de fórmula leucocitária do que um técnico treinado, e com exatidão similar [48].

A mesma empresa desenvolveu um sistema de captura de imagens que permite enviá-las de um pequeno laboratório para análise na mesma rede digital em um laboratório central; a captura de imagens toma 17 minutos para 200 células [49]. Informações estão disponíveis em www.cellavision.com.

Outros sistemas por reconhecimento de padrão disponíveis incluem EasyCell assistant (Medica), HemaCAM (Horn Imaging GmbH, Horiba medical) e HemoFAXS (TissueGnostics).

*N. de T. Programa de computador que imita o processamento do raciocínio no sistema nervoso central humano e baseia-se em um banco de dados armazenado sobre os diversos tipos celulares.

TABELA 2.5 Unidades, abreviações e símbolos usados para descrever parâmetros hematológicos

Parâmetro	Abreviação*	Unidade*	Símbolo*
Contagem de leucócitos	WBC (L)	número × 10 ⁹ /litro número/μL	/μL
Contagem de eritrócitos	RBC (E)	número × 10 ¹² /litro número × milhões/μL	M/μL
Concentração de hemoglobina	Hb	gramas/litro**, ou gramas/decilitro , ou milimoles/litro	g/L** g/dL mmol/L
Hematócrito	Hct	fração decimal: litro/litro porcentagem	(%)
Volume corpuscular médio	MCV (VCM)	fentolitros	fL
Hemoglobina corpuscular média	MCH (HCM)	picogramas , ou fentomoles	pg fm
Concentração hemoglobínica corpuscular média	MCHC (CHCM)	gramas/litro, ou gramas/decilitro , ou milimoles/litro, ou %	g/L g/dL mmol/L %
Contagem de Plaquetas	Plt (Plaq)	número × 10 ⁹ /litro número/microlitro	
Volume plaquetário médio	MPV (VPM)	fentolitros	fL
Plaquetócrito	Pct	litro/litro (vol./vol.) (fração decimal)	
Contagem de reticulócitos	Retic	número × 10 ⁹ /litro número/μL	
Velocidade de sedimentação globular (Westergren, 1 h)	ESR (VSG)	milímetros	mm
Unidades Internacionais		iu***	

*N. de T. Nas colunas **Abreviações**, **Unidades** e **Símbolos** estão em negrito e cor as usadas nesta tradução, por serem as preferidas no Brasil. Nas siglas constituídas de iniciais, estão em **negrito e cor** as versões com a ordem das letras usada em português. Para contagem de eritrócitos (RBC) não há uma sigla consagrada no Brasil; **E** (de **E**ritrócitos) foi criada para esta tradução. Não serão usadas siglas para contagens de leucócitos e plaquetas. Siglas para parâmetros que não têm uso generalizado, mas são fornecidos por alguns instrumentos, foram mantidas no idioma original inglês.

**g/L é preferida no Reino Unido.

***A abreviação aprovada para “unidades internacionais” é “iu”, mas IU persiste usada para fatores de coagulação.

Contadores hematológicos automatizados

Princípios operacionais dos contadores eletrônicos automatizados

Os mais recentes contadores de células sanguíneas totalmente automatizados aspiram e diluem uma amostra de sangue e determinam de 8 a mais de 60 parâmetros relacionados a eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Muitos deles também identificam a amostra (p. ex., pela leitura de código de barra), homogeneizam e transportam a amostra para a sonda

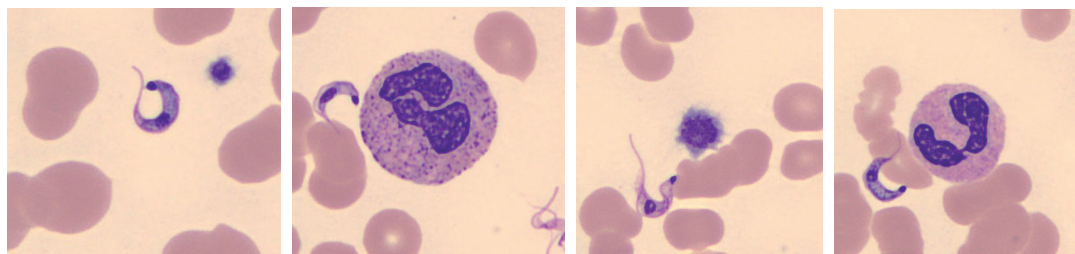


FIGURA 2.6 Imagens CellaVision DM96 de *Trypanosoma cruzi* em distensão de sangue. Doença de Chagas reativada em paciente transplantado. Cortesia do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil.

(probe) aspiradora, verificando se o volume foi adequado e se não há coágulos. Alguns são conectados a uma máquina automática de distender e corar lâminas. Para evitar manuseio desnecessário dos espécimes sanguíneos pelos operadores do instrumento, a amostra em geral é aspirada por perfuração da tampa. Com exceção da dosagem da Hb, todos os parâmetros dependem de contagem e de medida de partículas, sejam elas eritrócitos, leucócitos ou plaquetas; alguns parâmetros exigem ainda a determinação de outras características das partículas. As contagens e medidas podem ser feitas por impedância elétrica ou por dispersão de luz. Os instrumentos automatizados possuem pelo menos dois canais. Em um deles, é adicionado um diluente e são contados e medidos os eritrócitos e as plaquetas. No outro, é adicionado um agente lítico com o diluente, para reduzir os eritrócitos a estromas, deixando intactos os leucócitos para a contagem e produzindo uma solução na qual se pode dosar a Hb. São necessários mais canais para proceder à contagem diferencial dos leucócitos, com frequência dependente da avaliação das células de vários modos – por exemplo, pela tecnologia de impedância com corrente de diversas frequências, por dispersão e absorvância de luz. Um canal separado pode ser necessário para a contagem de reticulócitos.

Os instrumentos automatizados não conseguem identificar todas as anormalidades significativas identificadas pelo observador humano; são projetados para fornecer contagens sanguíneas exatas e reprodutíveis em espécimes normais ou que apresentem apenas anormalidades numéricas, bem como para alertar o operador do instrumento se o espécime apresentar características inusitadas que possam dar origem a determinações inexatas ou que exijam a microscopia de uma distensão sanguínea. Isso geralmente é denominado “alarme” (*flagging*). Os resultados apresentarão alarmes (i) quando a amostra de sangue contiver células blásticas, granulócitos imaturos, eritroblastos ou linfócitos atípicos;

(ii) quando houver plaquetas gigantes ou agregadas ou, por qualquer motivo, não for possível separar a população de eritrócitos da de plaquetas; e (iii) quando existir alguma anormalidade que possa originar resultados espúrios.

Um novo desafio aos instrumentos automáticos é a produção de índices hematimétricos exatos e a correta dosagem de hemoglobina em pacientes que receberam substitutos de sangue derivados de hemoglobina. Isso é possível com instrumentos Siemens, que medem individualmente o tamanho e a concentração de hemoglobina dos eritrócitos [50].

Na discussão sobre instrumentos automáticos, há inclusão de alguns que já estão em desuso: serve para esclarecer os princípios de operação e ilustrar o progresso e a melhoria da tecnologia subsequente até a atual.

Instrumentos Beckman-Coulter

As células sanguíneas são péssimas condutoras de eletricidade. Quando uma coluna de células em um meio condutor passa por uma pequena abertura pela qual circula uma corrente elétrica (Figura 2.7), há um aumento mensurável da impedância elétrica na abertura, à medida que passa cada célula; esse aumento é proporcional ao volume de material condutor deslocado e, portanto, ao volume celular. Assim, são contadas e medidas as células a partir dos impulsos elétricos que geram. Esse é o princípio da contagem por impedância, idealizado e desenvolvido por Wallace Coulter nas décadas de 1940 e 1950, iniciando a era moderna da contagem automatizada de células sanguíneas.

A impedância da abertura é determinada pela capacitância e pela indutância, bem como, pela resistência. Diversos fatores, além do volume celular, influem na amplitude, na duração e na forma do pulso e relacionam-se com a alteração das linhas elétricas de força e com o deslocamento do meio condutor. Tanto o formato como o volume celular são relevantes, de modo que células com maior

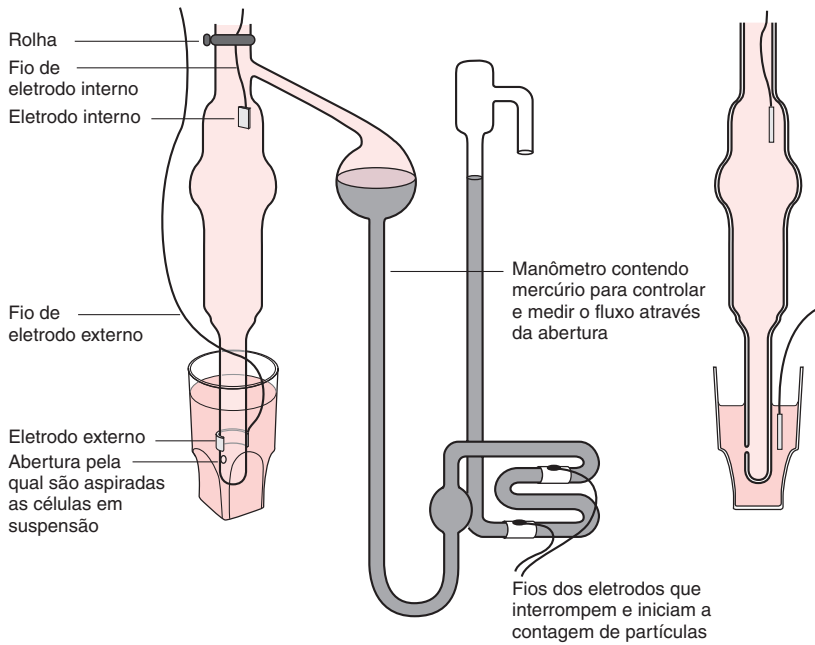


FIGURA 2.7 Representação semidiagramática de parte do contador Coulter, modelo FN, mostrando o tubo com abertura e o manômetro utilizado para medir o volume da suspensão de células contadas. À direita: representação diagramática de um corte transversal do tubo com abertura de um contador de impedância.

deformabilidade, que podem alongar-se quando passam pela abertura em resposta às tensões do fluxo, parecem menores do que verdadeiramente são, enquanto células rígidas parecem maiores [51]. Além disso, células que passam pela abertura fora do centro produzem impulsos aberrantes e parecem maiores do que são na realidade. Células que voltam a circular pela borda do campo elétrico produzem um impulso aberrante menor do que o produzido por células semelhantes ao passarem pela abertura; um eritrócito recirculante pode produzir um impulso semelhante ao de uma plaqueta passando pela abertura. Células que passam pela abertura ao mesmo tempo, ou quase ao mesmo tempo, são contadas e medidas como uma única célula; a falta de exatidão, assim introduzida, precisa ser corrigida, o que é conhecido como correção de coincidência. Impulsos aberrantes podem ser editados eletronicamente. O fluxo centrado em uma bainha de solvente, ou o enfoque hidrodinâmico, podem orientar as células para o centro da abertura, reduzindo os problemas produzidos pela coincidência e pelos impulsos aberrantes. Tanto o fluxo centrado quanto o de varredura atrás da abertura evitam a recirculação de células.

Contadores de impedância produzem determinações muito reprodutíveis do volume celular e do conteúdo e concentração de hemoglobina. Há, no

entanto, algumas inexatidões inerentes ao método que aumentam quando as células são anormais. O pulso de voltagem produzido pela passagem de uma célula pela zona do sensor pode ser considerado como uma sombra elétrica da célula, sugerindo uma partícula de determinado tamanho e formato. Um eritrócito normal passa pela abertura provavelmente em formato fusiforme ou em charuto [51], originando uma sombra elétrica semelhante a seu volume real, enquanto uma esfera produz uma sombra elétrica 1,5 vez seu volume real [51]. Um eritrócito rígido fixado parecerá ter um volume maior do que realmente tem. Além disso, a deformabilidade celular é uma função da concentração de hemoglobina dentro da célula. O efeito do formato da célula não é igual em todos os contadores de impedância. Em um estudo, a inexatidão foi maior com o Coulter STKR e o Cell-Dyn 3000 do que com o Sysmex K-1000, não sendo notada no Sysmex NE-8000 [52].

Os instrumentos Beckman-Coulter (anteriormente Coulter) determinavam a Hb por um método modificado de cianometemoglobina. Por exemplo, com o contador Coulter S Plus IV, a Hb era derivada da densidade óptica em comprimento de onda de aproximadamente 525 nm, depois de um tempo de reação de 20 a 25 segundos. Foi subsequentemente introduzido um reagente isento de cianeto para a

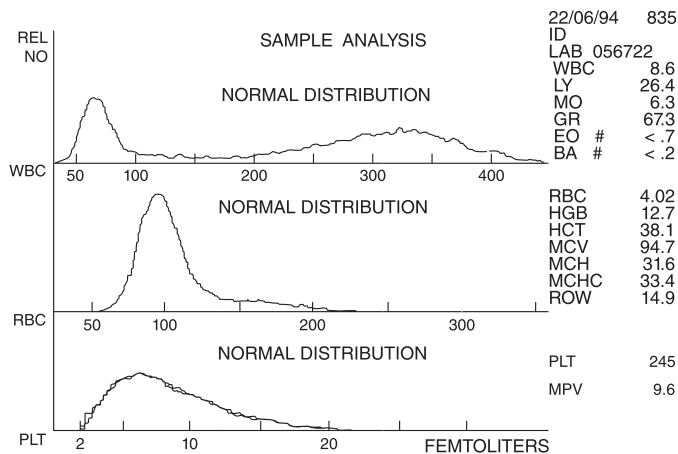


FIGURA 2.8 Histogramas produzidos por um contador Coulter S Plus IV mostrando a distribuição por volume dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

dosagem de hemoglobina. Os instrumentos Coulter contam e medem os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas pela tecnologia de impedância. Os eritrócitos e as plaquetas são contados e medidos no mesmo canal. Da determinação do VCM e da contagem de eritrócitos, deriva-se o Hct, e a determinação do VPM e a contagem de plaquetas permitem a derivação de um parâmetro equivalente das plaquetas, o plaquetócrito (Pct). Quando determinados por impedância, o VPM e (consequentemente) o plaquetócrito aumentam com a estocagem das amostras de sangue. A HCM é derivada da Hb e da contagem de eritrócitos. A CHCM é derivada da Hb, da contagem de eritrócitos e do VCM. A variação de tamanho dos eritrócitos é indicada pela amplitude de distribuição (volumétrica) dos eritrócitos (RDW* = *red cell distribution width*), que é o DP ou o CV das determinações individuais do volume eritrocitário. O parâmetro equivalente das plaquetas é a amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas (PDW* = *platelet distribution width*). Com frequência, há alguma superposição de tamanho entre eritrócitos pequenos e plaquetas grandes. Dependendo do modelo do instrumento, as plaquetas podem ser distinguidas dos eritrócitos por um limiar fixo, por exemplo, em 20 fL, ou por um limiar móvel, ou podem ser utilizados os dados das contagens entre dois limiares, por exemplo, 2 e 20 fL, para estabelecer uma curva que é extrapolada, fazendo as plaquetas que caírem fora desses limiares, por exemplo, entre 0 e 70 fL, também serem incluídas na

*N. de T. As siglas RDW e PDW, embora representem “amplitude de distribuição” (feminina), consagraram-se em português como masculinas.

contagem. Os leucócitos são contados em outro canal, o canal Hb, após lise dos eritrócitos. Nos instrumentos antigos, os eritroblastos eram incluídos na contagem de leucócitos. Eram fornecidos histogramas da distribuição por volume dos leucócitos, dos eritrócitos e das plaquetas (Figura 2.8). Uma contagem diferencial de leucócitos, baseada em volumetria por impedância após remoção parcial dos citoplasmas, classificava-os em granulócitos, linfócitos e células mononucleares.

Instrumentos Beckman-Coulter com fórmula diferencial em 5 partes, incluindo LH 750 e LH 780

A geração seguinte de instrumentos Coulter totalmente automatizados – Coulter STKS, MAXM, HmX, Gen S, LH 750 e LH 780) – fornece uma contagem diferencial de leucócitos em cinco tipos celulares, com base em diversas características físicas dos leucócitos, depois da remoção parcial do citoplasma (Figura 2.9 e Tabela 2.6)**. São feitas três determinações simultâneas em cada célula: (i) medida da impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência, dependente principalmente do volume celular; (ii) medida da condutividade com corrente eletromagnética de alta frequência (radio-frequência), que altera a camada bipolar lipídica da membrana da célula e permite que a corrente penetre e torne-se dependente sobretudo da estrutura interna da célula, incluindo relação núcleo-citoplasmática, densidade nuclear e granularidade; (iii) dispersão frontal da luz em 10-70°, quando as

**N. de R.T. Essa tecnologia foi denominada VCS (Volume, Conductivity, laser Scatter).

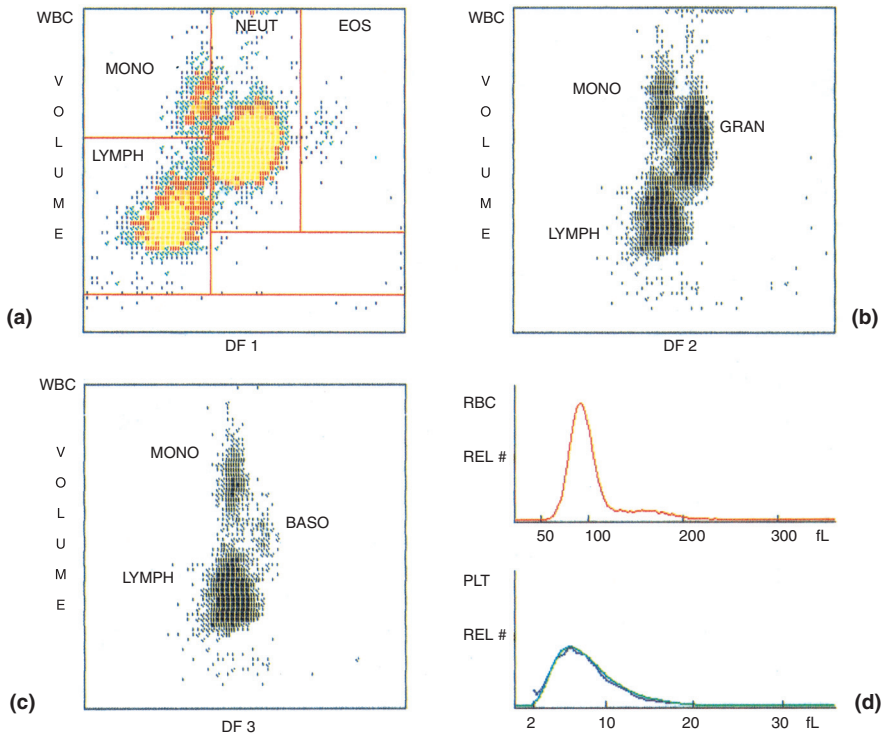


FIGURA 2.9 Resultado impresso do contador Coulter STKS. (a) *Scatter plot* do volume dos leucócitos contra a função discriminante 1. Há quatro populações de leucócitos: NEUT, neutrófilos; EOS, eosinófilos; MONO, monócitos; e LYMPH, linfócitos. (b) *Scatter plot* do volume dos leucócitos contra a função discriminante 2, mostrando três populações de leucócitos: GRAN, neutrófilos, eosinófilos e basófilos; MONO, monócitos; e LYMPH, linfócitos. (c) *Scatter plot* do volume dos leucócitos contra a função discriminante 3, mostrando três populações de leucócitos: BASO, basófilos; MONO, monócitos; e LYMPH, linfócitos. (d) Histogramas mostrando a distribuição de volume dos eritrócitos e das plaquetas.

células passam por um feixe *laser*, determinada pela estrutura, formato e reflexividade da célula. Nos instrumentos mais recentes (p. ex., Gen S, LH 750 e LH 780), o *software* permite melhor análise desses dados: as medidas de condutividade são corrigidas para a influência do volume celular de modo a refletir mais acuradamente a estrutura celular interna e a relação núcleo-citoplasmática – denominada “opacidade”; as medidas de dispersão de luz também são corrigidas para o efeito do volume celular, de modo a distinguir melhor os diferentes tipos celulares – e passa a denominar-se “dispersão luminosa rotada”. A abreviação VCS – volume, condutividade, *scatter* (dispersão) – passa a ser usada. São discriminadas cinco populações pela análise tridimensional dos *clusters* (conglomerados) de células, com base no volume celular, na opacidade e na dispersão luminosa rotada; os *clusters* são separados por limiares curvilíneos móveis. A representação gráfica dos *clusters* é feita plotando-se o volume celular contra cada uma das três funções discriminantes derivadas dos dados. A plotagem do tamanho

contra a função discriminante 1 (derivada principalmente da dispersão de luz) separa as células em quatro grupos: neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos mais basófilos (Figura 2.9a). Os basófilos estão no quadrante superior direito da caixa de linfócitos. A plotagem do tamanho contra a função discriminante 2 (baseada na condutividade com corrente eletromagnética de alta frequência) separa as células em três grupos: linfócitos, monócitos e granulócitos (Figura 2.9b). A plotagem do tamanho contra a função discriminante 3, obtida por *gating* (remoção específica) dos neutrófilos e dos eosinófilos, mostra os basófilos como um conglomerado separado dos linfócitos e dos monócitos (Figura 2.9c). Além desses, há um *scatter plot* (gráfico da dispersão) tridimensional multicolorido.

Com os mais recentes instrumentos, LH 750 e LH 780, as contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas têm reprodutibilidade melhorada porque são feitas em triplicata, e as de leucócitos e plaquetas, pelo alongamento do tempo de contagem se forem muito baixas. Partículas maiores do que 35 fL, após a lise

TABELA 2.6 Tecnologia empregada em contadores totalmente automatizados que realizam contagens diferenciais em 5 a 7 partes

Instrumento	Tecnologia
STKS, Gen S, LH 750, LH 780 e Unicel DxH 800 (Beckman-Coulter)	(i) Impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência (ii) Condutividade com corrente eletromagnética de alta frequência (iii) Dispersão de raio <i>laser</i>
Contador A ^c T 5diff (Beckman-Coulter)	(i) Impedância após lise diferencial (ii) Impedância e citoquímica de absorção (após interação com clorazol-negro)
Sysmex SE-9000 (Sysmex Corporation)	(i) Impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência (ii) Impedância com corrente eletromagnética de alta frequência (iii) Impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência em baixo e alto pH
Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation)	(i) Impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência (ii) Impedância com corrente eletromagnética de radiofrequência (iii) Dispersão frontal da luz (iv) Dispersão lateral da luz (v) Intensidade de fluorescência após interação com um corante fluorescente de polimetina
Série H.1, série Advia 120 (Bayer-Technicon, Siemens)	(i) Dispersão da luz após reação de peroxidase (ii) Absorvância da luz após reação de peroxidase (iii) Dispersão da luz após remoção do citoplasma das células, menos os basófilos, por agente lítico em baixo pH
Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics)	(i) Dispersão frontal da luz (ii) Dispersão da luz em ângulo estreito (iii) Dispersão ortogonal da luz (iv) Dispersão ortogonal da luz polarizada
Cell-Dyn 4000 (Abbott Diagnostics)	Como anteriormente, mais: (v) Contagem de eritroblastos após marcação com corante fluorescente
ABX Pentra 120Retic (Horiba ABX Diagnostics)	(i) Impedância (ii) Absorvância da luz após coloração de grânulos com clorazol-negro E (iii) Impedância depois da remoção preferencial do citoplasma dos basófilos em baixo pH

dos eritrócitos, são contadas como leucócitos. O instrumento é capaz de contar eritroblastos e corrigir a contagem de leucócitos por essa interferência [53]. As plaquetas são contadas entre 2 e 20 fL, mas a curva é extrapolada até 70 fL para incluir plaquetas grandes. Os reticulócitos podem ser contados em um módulo separado (ver adiante). Um novo parâmetro eritrocítico, o “volume corpuscular esferado médio” (MSCV), uma medida artificial no canal de reticulócitos, representa o volume médio dos eritrócitos tornados esféricos em condições hipo-osmóticas [54]. Normalmente, o MSCV é maior do que o VCM (dos eritrócitos não esferados), e uma inversão dessa relação sugere a presença de esferocitose ou defeito similar de formato [54]. Notou-se que o MSCV diminui nos atletas durante treinamento, e que isso se correlaciona com sinais de hemólise [55]. Um novo parâmetro denominado baixa densidade hemoglobínica (%LHD) é obtido por transformação matemática da CHCM; notou-se que se correlaciona com a %*Hypo* dos instrumentos Siemens (ver adiante) e é um indicador útil de redução da disponibilidade de ferro, por exemplo, no tratamento com eritropoetina da anemia da insuficiência renal crônica [56]. Ainda há mais

um parâmetro que pode ser calculado: o fator de anemia microcítica (Maf) = $(Hb \times VCM) \div 100$, usado para avaliar falta de reservas de ferro e eritropoese com baixa disponibilidade de ferro em atletas [57].

O LH 750 mostra quatro *flags* para suspeita de blastos – NEBlast, LYBlast, MOBlast e VARIANT LY; em conjunto, parecem menos sensíveis mas mais específicos que os quatro *flags* para blastos do Advia-Siemens [58]. Os dados diferenciais de leucócitos no Coulter Gen S, no LH 750 e no LH 780 podem ser usados como alarme em amostras contendo parasitos da malária [59, 60]. Uma função estatística do LH 750, com base nos dados do VCS de linfócitos e na contagem de plaquetas também pode ser usada como *flag* para a dengue [60].

Em pacientes com leucemia aguda ou suspeitos de coagulação intravascular disseminada, a contagem de plaquetas do LH 750 mostra boa correlação com o método internacional de referência, mas o declive da linha obtida ao plotá-lo contra a referência indica subestimação [61]. O VPM pode ser inexacto (no LH 750) na presença de plaquetas muito grandes: podem não ser reconhecidas e excluídas da contagem [62].

As determinações por VCS no LH 750 podem também fazer estimativa do volume neutrofílico médio (MNV), da amplitude de distribuição dos neutrófilos (NDW), do volume linfocítico médio (MLV), da amplitude de distribuição dos linfócitos (LDW) e do volume monocítico médio (MMV). Em um trabalho, o MNV mostrou-se superior à contagem de leucócitos e à porcentagem de neutrófilos na detecção de sepse em adultos [63]. Em um segundo trabalho, MNV e NDW mostraram maior sensibilidade e especificidade na detecção de infecção do que a contagem manual de neutrófilos bastonados, o número absoluto de neutrófilos e a proteína C-reativa [64]. Trabalho ulterior mostrou que o MNV e o MMV correlacionam-se com sepse; essas determinações foram menos informativas do que a dosagem de interleucina 6, mas tiveram sensibilidade e especificidade iguais à de proteína C-reativa [65]. Em um estudo em pacientes da unidade de tratamento intensivo, o NDW mostrou-se discriminativo entre pacientes com infecção e pacientes com inflamação aguda e, nesse aspecto, superior à proteína C-reativa e à procalcitonina; todos os três parâmetros puderam distinguir pacientes com infecções localizadas de pacientes com infecções sistêmicas [66]. Em pacientes em pós-operatório, um aumento de MNV e NDW foi notado em pacientes com infecção, diferenciando-os de pacientes sem infecção [67]. Crianças e adolescentes com sepse bacteriana mostraram aumento de NDW e LDW [68]. Da mesma forma, em trabalho com o LH 780, o MNV e o NDW foram úteis no diagnóstico de sepse neonatal [69]. Em um segundo estudo, usando o LH 750, MNV e proteína C-reativa mostraram ser as determinações mais úteis ao diagnóstico de sepse neonatal [70].

Alterações da média de condutividade elétrica e de dispersão de luz dos neutrófilos (C e S da tecnologia VCS, no LH 750) indicativas de hipogranularidade, podem ser evidência de mielodisplasia [71]. O MNV pode estar também reduzido [72].

Os modelos LH 750 e 780 incorporam um cálculo que relaciona o volume reticulocítico médio (MRV) com o dos eritrócitos maduros (VCM) e gera um fator dimensional global dos eritrócitos (*red cell size factor*, RSf). A fórmula usada é $\sqrt[3]{\text{VCM} \times \text{MRV}}$, isto é, a raiz quadrada do produto (= média geométrica) do volume corpuscular médio pelo volume reticulocítico médio [73]. Os valores correlacionam-se com o Ret-He dos instrumentos Sysmex; são baixos na deficiência de ferro e no traço talassêmico e costumam diminuir quando se instala uma deficiência funcional de ferro, como em pacientes sob tratamento com eritropoetina [73]. A %LDH fornecida pelo LH 780 seria útil para distinguir a deficiência de ferro, isolada ou como complicação de uma

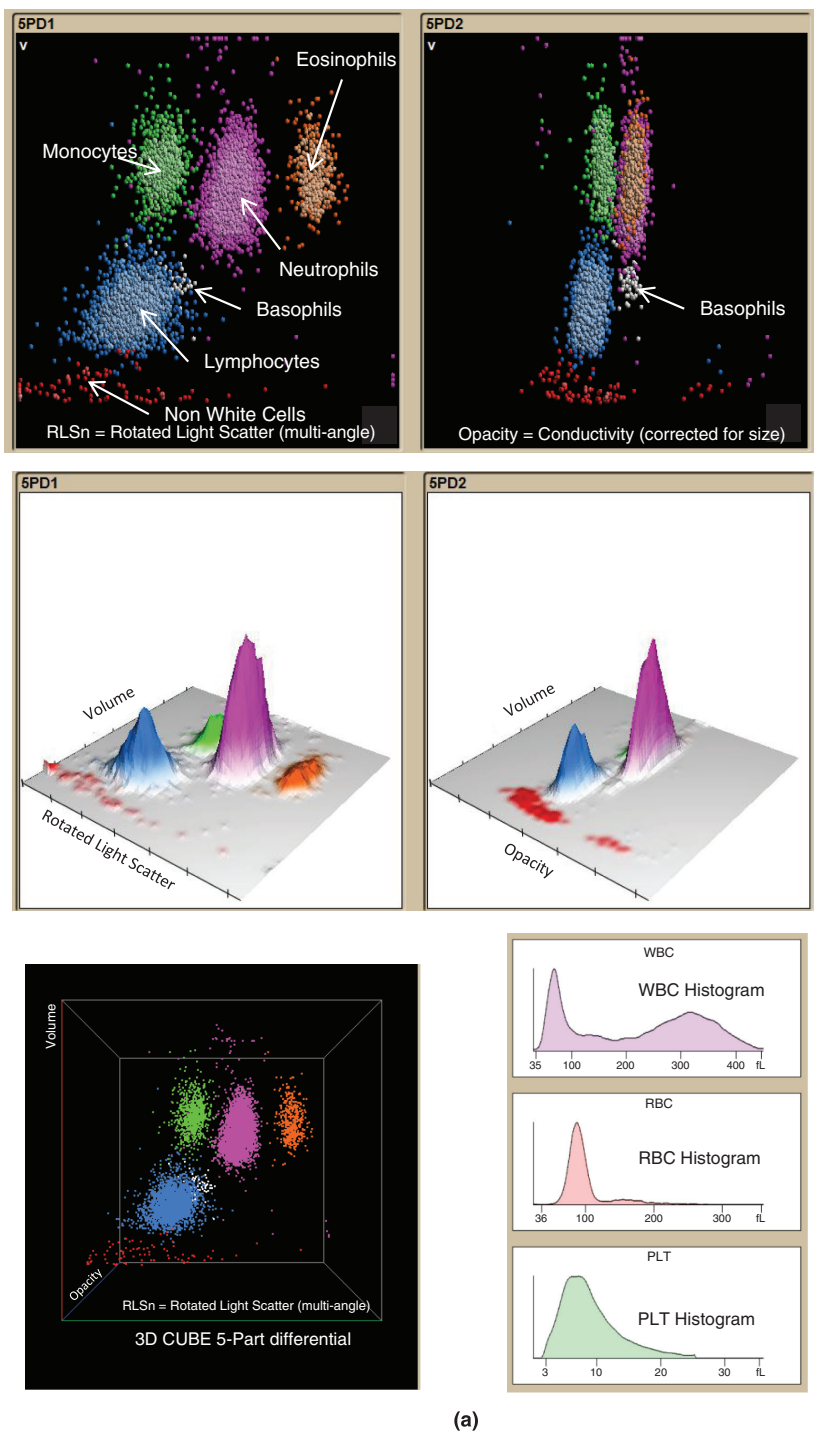
anemia de doença crônica, da anemia de doença crônica com boas reservas de ferro [74].

Um curioso artefato em distensão sanguínea, oriundo da contaminação da amostra com eritrócitos de ave, de um tubo puncionado várias vezes de material de controle de contagem de reticulócitos, foi evidenciado em determinação feita no LH 750 [75].

Beckman-Coulter Unicel DxH 800

O Beckman-Coulter Unicel DxH 800 fornece um hemograma com contagem diferencial de leucócitos em cinco tipos, contagem de eritroblastos e contagem de reticulócitos. A contagem diferencial, incluindo eritroblastos e “granulócitos imaturos”, é baseada em impedância (volume) e radiofrequência (condutividade), mas com uma melhoria do sistema VCS na medida por *light scatter* que é feita com cinco determinações em relação aos instrumentos mais antigos (Figura 2.10). Volume médio, variação de volume e outras informações com base em morfologia são fornecidas para todas as subpopulações: o conjunto é designado “dados da população celular” (*cell population data*, CPD). A Hb é corrigida quando a contagem de leucócitos “não corrigida” é igual ou maior que 11.000/ μL . A contagem de eritrócitos é corrigida quando a de leucócitos for igual ou maior que 140.000/ μL ; se houver evidência que esta contagem também interfere nos histogramas eritroides, o VCM e o RDW (como CV e DP) são igualmente corrigidos. A contagem de plaquetas baseia-se em medidas entre 2 e 25 fL com uma curva adaptada que exclui fragmentos de eritrócitos; *flags* indicam a probabilidade da presença de plaquetas gigantes, agregados plaquetários e de interferência tanto no limiar inferior como no superior.

Os *flags* do DxH 800 comprovaram-se mais sensíveis e específicos do que os do LH 750, e tornaram-se menos frequentes na série de determinações [77]. A sensibilidade à identificação de blastos mostrou-se superior à do LH 750 [78], e a sensibilidade e exatidão na detecção e contagem de eritroblastos, superiores às do LH 780 [76]. O DxH 800 mostrou-se mais acurado do que o LH 780 na contagem de eritroblastos em adultos [79] e do que o Cell-Dyn Sapphire na contagem de eritroblastos em amostras pediátricas e neonatais [80]. Mostrou-se também superior ao LH 750 e ao Advia 2120 na identificação de eritroblastos em amostras neonatais [81]. Achados relativos a pacientes com sepse são similares aos do LH 750 e do LH 780: MNV, NDW, MMV e MDW (estão aumentados, e as medidas de *light scatter* estão diminuídas na maioria dos neutrófilos [82]. Os CPDs de neutrófilos e monócitos permitem predição de pega de transplante de células-tronco



(a)

FIGURA 2.10 Cópias impressas das imagens digitais fornecidas pelo Beckman-Coulter DxH 800. (a) *Scatter plots* do canal diferencial de cinco partes 1 (5PD1) e do canal diferencial de cinco partes 2 (5PD2), mostrando o volume (v) plotado contra a dispersão de luz rotada em ângulo múltiplo (RLSn) (parte superior, à esquerda) e volume contra opacidade (parte superior, à direita); nas representações tridimensionais (no centro), as alturas dos picos representam os números de células; um *plot* tridimensional composto (parte inferior, à esquerda) pode ser rotado com o *mouse* para demonstrar diferentes populações; histogramas (parte inferior, à direita) mostram o tamanho dos leucócitos (WBC), dos eritrócitos (RBC) e das plaquetas (PLT) nos seus respectivos canais. (continua)

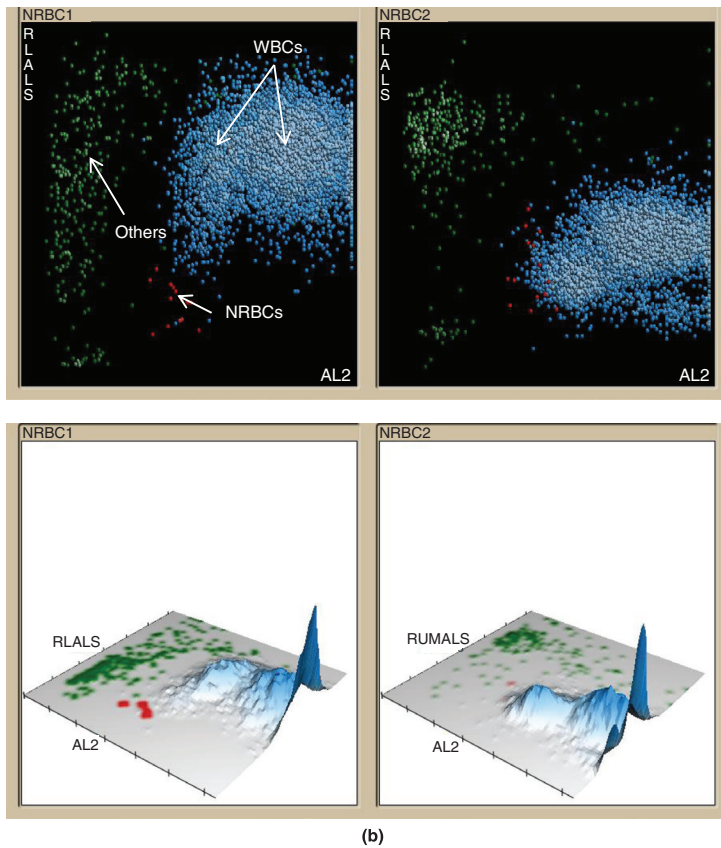


FIGURA 2.10 Continuação (b) Plots bidimensionis e tridimensionais do canal de eritroblastos (NRBC) mostrando a separação destes dos leucócitos; duas medidas de dispersão de luz, RLALS (NRBC1, esquerda) e RUMALS (NRBC2, à direita), são plotadas contra a perda de luz axial (AL2), que mede a luz absorvida quando as células passam pela *flow cell* (um indicador do tamanho, mas, também, influenciado pela transparência). Cortesia da Beckman-Coulter.

hematopoéticas alguns dias antes do que a contagem absoluta de neutrófilos [83].

O DxH 800 tem quase 100% de sensibilidade e especificidade na detecção do parasita da malária, *P. falciparum* *vivax*: surge um sinal anormal no *plot* de eritroblastos (NRBC) [84].

Plataforma HematoFlow

A plataforma HematoFlow Beckman-Coulter virtualmente integra um instrumento automático DxH 800 e um citômetro de fluxo FC500 usando um programa de intermediação para fornecer um hemograma completo com contagem diferencial de 16 partes [85, 86]. O FC500 usa seis anticorpos monoclonais diretamente marcados (CD2, CD16, CD19, CD36, CD45 e CD294) em um reagente único de cinco cores, CytoDiff [85, 86]. Sendo uma plataforma baseada em anticorpos, o sistema HematoFlow não pode contar monócitos em pacientes com deficiência congênita de CD36. Da

mesma forma, neutrófilos do tipo III CD16-negativos em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna não serão reconhecidos e serão identificados como granulócitos imaturos [87]. Geralmente, há boa concordância entre as contagens diferenciais do Sysmex XE-2100 e do DxH 800, com a exceção da contagem de basófilos [86]. Há exemplos ocasionais de superestimação de monócitos, e uma basofilia espúria foi observada em paciente no qual alguns linfócitos foram classificados como basófilos [86]. Em um trabalho, foram identificados blastos de leucemia mieloide aguda (LMA) e de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linhagem B, mas não de LLA de linhagem T [85]. Outros trabalhos mostraram boa sensibilidade do sistema para a detecção de blastos [87]. Muitos dos trabalhos publicados necessitaram do uso de técnicas de remoção de células específicas (*gating*), e a recente introdução de um algoritmo de automatização do *gating* pode melhorar a qualidade dos resultados.

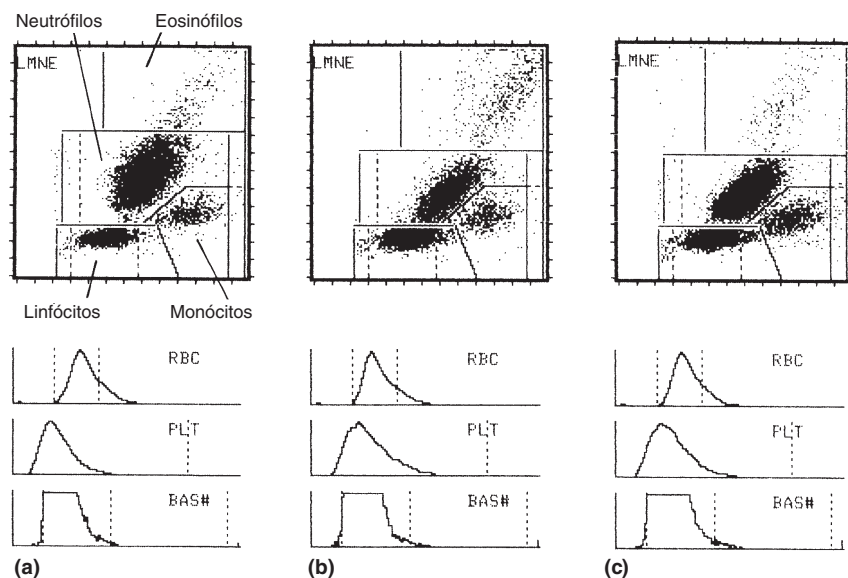


FIGURA 2.11 Gráfico de dispersão e histogramas produzidos pelo Beckman-Coulter A*T 5diff: (a) normal; (b) amostra com eosinofilia; (c) amostra com monocitose.

Contador A*T 5diff

Outro instrumento Beckman-Coulter, o contador A*T 5diff, fornece uma fórmula diferencial de cinco elementos por medidas em dois canais (Figura 2.11 e Tabela 2.6). A contagem de leucócitos e a de basófilos são feitas por impedância após lise diferencial; os basófilos são mais resistentes à perda do citoplasma em meio ácido. Os outros tipos celulares são identificados em um segundo canal, com uma combinação da medida do volume (por impedância) e citoquímica e absorvância (após interação com negro-clorazol). O negro-clorazol liga-se aos grânulos dos eosinófilos (muito fortemente), dos neutrófilos (de modo intermediário) e dos monócitos (fracamente); os linfócitos não se coram. Os princípios usados têm algo em comum com os usados nos instrumentos Siemens (ver adiante) e a tecnologia empregada é similar à empregada em alguns instrumentos Horiba (ver adiante). O instrumento requer uma amostra muito pequena de sangue, por isso é adequado para uso em pediatria.

Informações sobre os instrumentos Beckman-Coulter estão disponíveis no *website* da empresa, www.beckman.com.

Sysmex e outros instrumentos que incorporam medidas de impedância

Depois da expiração da patente da Coulter Electronics, diversos fabricantes lançaram contadores de impedância, operando com princípios semelhantes;

entre eles, destacam-se os da Sysmex Corporation. Alguns deles integram o tamanho dos pulsos do canal de eritrócitos para produzir o Hct e derivam o VCM deste e da contagem de eritrócitos, enquanto outros fazem o contrário. Os parâmetros produzidos são semelhantes aos dos analisadores Coulter, alguns deles incluindo uma contagem diferencial em três tipos celulares ou, com tecnologia adicional, cinco ou seis tipos celulares. Plaquetas são separadas de eritrócitos por limiares fixos ou móveis; às vezes, um histograma plaquetário é extrapolado além de um ou outro limiar. Na maioria desses instrumentos, o RDW representa o DP das medidas do tamanho celular, mas os instrumentos Sysmex dão a opção de representá-lo pelo CV. A maioria dos contadores de impedância determinava a Hb por um método de cianometemoglobina modificado; atualmente, estão preferindo métodos isentos de cianeto. Os instrumentos Sysmex usam um método de lauril-sulfato.

Sysmex SE-9000

O Sysmex SE-9000 e os instrumentos ulteriores têm um canal de Hb separado do canal da contagem de leucócitos, o que permite o emprego de um agente lítico forte, que impede que altas contagens de leucócitos interfiram na dosagem de Hb. A dosagem de Hb é feita pelo método lauril-sulfato. Há limiares móveis tanto para os eritrócitos quanto para as plaquetas, ambos contados por tecnologia de

impedância. Como nos instrumentos anteriores, são fornecidos histogramas da distribuição por volume dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas (Figura 2.12a). Neste e em alguns outros instrumentos Sysmex (K-1000 e NE-8000), o VCM aumenta com a desoxigenação e diminui com a oxigenação [16]; a CHCM sofre alteração inversa. É provável que esse efeito seja observado com outros contadores de tecnologia similar, pois no micro-Hct há o mesmo fenômeno. O NE-8000 não mostra a mesma inacurácia no VCM e na CHCM na presença de eritrócitos

hipocrômicos, como ocorre no Coulter STKR; essa inacurácia é intermediária no K-1000 [52].

O SE-9000 fornece uma contagem diferencial em cinco partes, pela combinação dos dados de três canais (ver Tabela 2.6). No canal granulócitos-linfócitos-monócitos, os leucócitos são separados dos estromas dos eritrócitos e dos grumos de plaquetas, sendo divididos em três *clusters* principais (Figura 2.12b) por uma plotagem de medidas de capacitância por radiofrequência contra medidas de impedância em corrente contínua. As determinações de

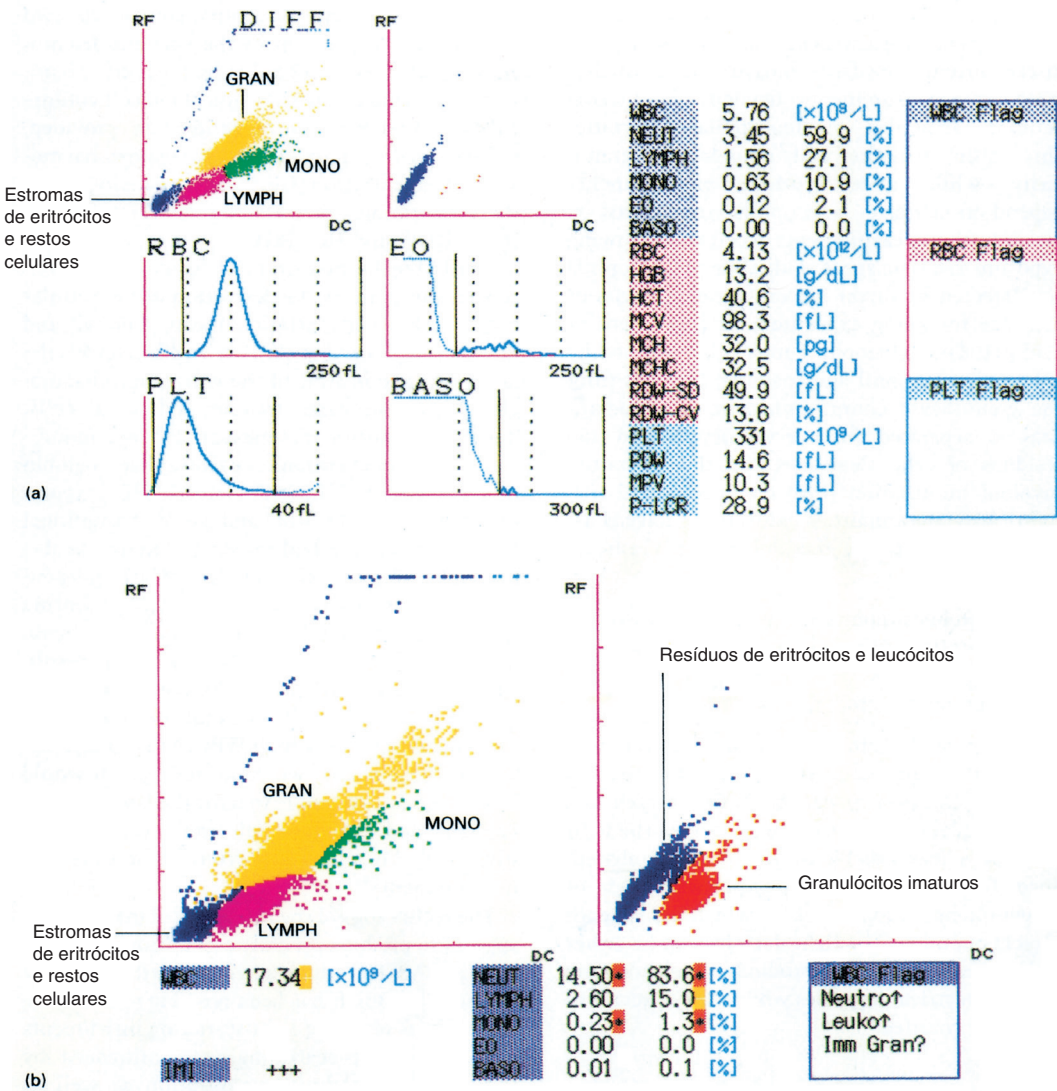


FIGURA 2.12 Resultado impresso do analisador hematológico automatizado Sysmex SE-9000. (a) *Scatter plots* dos leucócitos e histogramas de volume de eritrócitos, plaquetas, eosinófilos e basófilos em uma amostra normal. (b) *Scatter plots* dos leucócitos – radiofrequência (RF) contra corrente contínua (DC) – de uma amostra anormal com aumento de granulócitos imaturos. As populações de leucócitos apresentadas são: GRAN, granulócitos; LYMPH, linfócitos; MONO, monócitos (à esquerda); e granulócitos imaturos em um *cluster* separado dos eritrócitos e dos resíduos de outros leucócitos (à direita).

radiofrequência dependem da estrutura celular interna – relação nucleo-citoplasmática, estrutura da cromatina e granularidade citoplasmática –, enquanto as medidas por corrente contínua dependem do tamanho celular. Os eosinófilos são identificados pela medida por corrente contínua do tamanho celular, após exposição a um agente lítico em pH alcalino, e os basófilos, em pH ácido. A contagem de neutrófilos é determinada subtraindo-se as contagens de basófilos e de eosinófilos da contagem de granulócitos. Podem-se separar os granulócitos imaturos dos eritrócitos e dos resíduos de outros leucócitos no canal chamado *immature myeloid information* (IMI) (Figura 2.12b, à direita). Assim, todas as anormalidades gerarão alarmes: “desvio à esquerda?”, “granulócitos imaturos?” e “blastos?”.

Considera-se o índice de imaturidade mioelide útil para prever um aumento de células CD34+ em pacientes em preparação para coleta de células-tronco periféricas para transplante, indicando o momento de início da monitorização pela contagem de CD34+ por citometria em fluxo [88].

Sysmex XE-2100

O Sysmex XE-2100 [89], introduzido em 1999, incorpora citometria em fluxo com fluorescência a um instrumento de múltiplos canais, que incluem *laser*, corrente contínua (para medidas de impedância) e corrente em radiofrequência (para determinar a estrutura interna das células), para fazer a contagem diferencial (Figura 2.13). Uma polimetina fluorescente combina-se com os ácidos nucleicos (DNA nuclear e RNA nas organelas citoplasmáticas) de células “permeabilizadas”. O instrumento tem a capacidade de contar reticulócitos, identificar e contar plaquetas contendo RNA, e identificar e contar eritroblastos, células mieloides imaturas (promielócitos, mielócitos e metamielócitos – IG) e células hematopoéticas progenitoras (HPCs). O reconhecimento destas últimas depende do maior conteúdo de lipídios na membrana citoplasmática, o que as torna mais resistentes a um processo de lise diferencial do que células maduras. Blastos podem ser diferenciados de células menos imaturas. (Figura 2.14). O XE-2100 pode operar no módulo CBC-DIFF, no qual é feita uma contagem total de

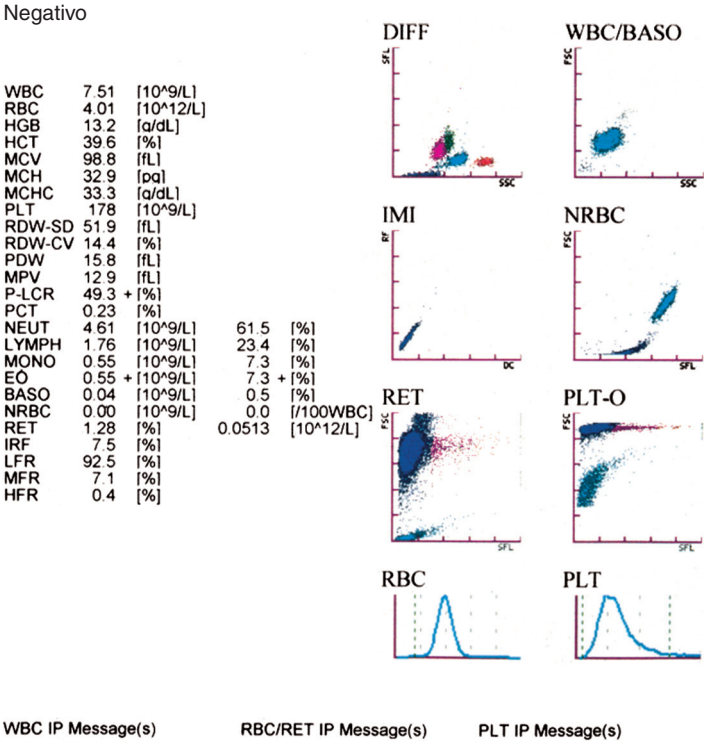


FIGURA 2.13 Scatter plots e histogramas do Sysmex XE-2100 mostrando os *clusters* de leucócitos (DIFF), os canais de contagem de leucócitos/basófilos (WBC/BASO), granulócitos imaturos (IMI), eritroblastos (NRBC), o canal de reticulócitos (RET), a contagem óptica (fluorescente) de plaquetas (PLT-O) e os histogramas de eritrócitos e plaquetas (RBC e PLT).

células nucleadas (CTCN) e há alarme para eritroblastos, ou no módulo NRBC, em que os eritroblastos são contados e a contagem de leucócitos é computada subtraindo-os da CTCN. Esse instrumento também é capaz de contar plaquetas tanto por impedância como por um método óptico (após interação com um corante-fluorescente), este no canal de reticulócitos. Em baixas contagens de plaquetas, a contagem óptico-fluorescente é mais acurada [90], ao passo que, em contagens altas, a linearidade da impedância é melhor. A melhor escolha, entretanto, depende também da causa da trombocitopenia. Pacientes sob quimioterapia podem ter fragmentos de leucócitos que superestimam a contagem óptica, enquanto em pacientes trombocitopênicos com plaquetas grandes, como na púrpura trombocitopênica autoimune ou púrpura trombocitopênica trombótica, a contagem óptica geralmente é mais acurada. O instrumento tem um algoritmo de seleção da

contagem mais acurada e este não deve ser desligado [91]. Em pacientes com leucemia aguda ou suspeita de coagulação intravascular disseminada, a contagem de plaquetas mostra boa correlação entre os dois métodos e a contagem pelo método internacional de referência, mas o declive da linha de regressão indica subestimação da contagem [61]; contagens espúrias são mais prováveis quando há ativação das plaquetas. Inacurácia na impedância pode ocorrer na presença de fragmentos de eritrócitos ou de plaquetas gigantes. Inacurácia nas contagens óptico-fluorescentes pode ocorrer na presença de restos celulares, como em leucemias. A fração de plaquetas imaturas (IPF) costuma aumentar em condições em que há aumento do *turnover* plaquetário, como na púrpura trombocitopênica autoimune, na púrpura trombocitopênica trombótica e na hipertensão associada à gestação [92]. A IPF também é preditiva da recuperação da medula óssea

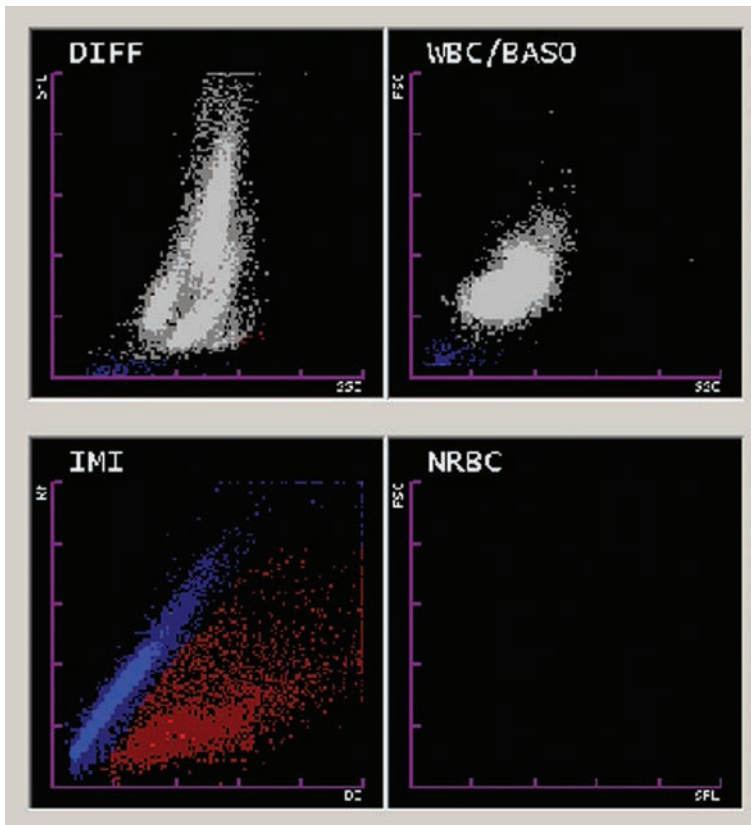


FIGURA 2.14 Resultados do Sysmex XE-2100 de amostra de sangue de paciente com leucemia mieloide aguda, mostrando *scatter plots* dos clusters de leucócitos (DIFF), do canal contagem de leucócitos/basófilos (WBC/BASO), do canal *immature myeloid informations* (IMI) e de eritroblastos (NRBC). A contagem de leucócitos era 38.200/ μ L, com *flags* para blastos e granulócitos imaturos. O *scatter plot* IMI mostra uma população de blastos e precursores mieloides (em vermelho) e outra população que representa granulócitos maduros e estromas de eritrócitos (em azul).

após transplante de células-tronco. Nas localizações geográficas apropriadas, a pseudobasofilia com trombocitopenia mostra-se altamente preditiva de dengue [93].

Os múltiplos canais do XE-2100 são os seguintes:

- 1 Canal de hemoglobina, usando um agente lítico potente e um reagente isento de cianeto (lauril-sulfato).
- 2 Canal de eritrócitos/plaquetas, que mede e conta por impedância em um fluxo com foco hidrodinâmico. Além dos parâmetros eritrocíticos usuais, são fornecidos volume plaquetário médio, amplitude de distribuição das plaquetas (amplitude do histograma de tamanho a 20% da altura do pico) e porcentagem de plaquetas grandes (*platelet large cell ratio* – P-LCR, plaquetas maiores de 12 fL expressas como porcentagem). Um aumento da porcentagem de plaquetas grandes foi descrito em pacientes com hiperlipidemia, e sugeriu-se que poderia causar um aumento de risco de trombose [94]. Na púrpura trombocitopênica autoimune, tem sido notado um aumento de MPV, PDW e P-LCR em comparação com a anemia aplástica [95]. Nas determinações por impedância, o VPM pode ser inacurado na presença de plaquetas muito grandes pois estas podem ser excluídas da medida [62]. Os parâmetros da série vermelha incluem RBC-Y, que é o valor médio da dispersão da luz frontal, proporcional ao conteúdo hemoglobínico dos eritrócitos; os valores tendem a paralelismo com a HCM.
- 3 Canal de fórmula diferencial, em que são identificados neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos pela análise dos *clusters* após a interação com um corante fluorescente baseado em polimetina. São medidas: dispersão lateral da luz (NEUT-X, indicativa da estrutura interna das células), dispersão frontal (indicativa do tamanho celular) e intensidade da fluorescência (NEUT-Y, indicativa do conteúdo de DNA e RNA, e assim, do tamanho do núcleo). Granulócitos imaturos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos) são contados nesse canal. Uma porcentagem aumentada foi descrita como preditiva de infecção; embora tenha se mostrado mais preditiva que a contagem global de leucócitos, não pareceu melhor do que a contagem absoluta de neutrófilos [96]. NEUT-X aumenta no período pós-parto, em infecção, após tratamento com fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) e em outras circunstâncias em que os neutrófilos mostrem-se hipergranulares [97]; também

aumenta nas anemias megaloblásticas [98]. Pode diminuir nas síndromes mielodisplásicas (SMDs) e na leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), correlacionando-se com a observação microscópica de hipogranularidade [97, 98]. NEUT-Y aumenta no pós-parto e pode diminuir em SMD e LMMC [97]. Em um trabalho, os *scatter plots* mostraram-se algumas vezes anormais na malária por *Plasmodium vivax* e, menos vezes, na malária por *Plasmodium falciparum*, com casos mostrando pseudoeosinofilia [99]. Em outro trabalho, foram notados *scatter plots* anormais na infecção por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, mas não na infecção por *P. falciparum* [100]. Em pacientes com leucemia linfocítica crônica, a contagem de linfócitos mostrou-se exata quando comparada com a fórmula manual feita em lâminas de sangue albuminizado, podendo substituí-la na rotina [101]. A contagem absoluta de neutrófilos mostrou-se acurada e precisa, mesmo quando muito baixa [102].

- 4 Canal de leucócitos/basófilos que lisa todas as células exceto os basófilos, de modo que estes podem ser diferenciados dos outros leucócitos por análise de *clusters* usando dispersão de luz frontal e lateral. Em um trabalho, a contagem de basófilos mostrou baixa correlação com a contagem por citometria em fluxo, com coeficiente 0,64, melhorando para 0,90 ao serem excluídas amostras com *flags* para leucócitos anormais [103]. Pseudobasofilia foi evidenciada em 5/112 amostras [103].
- 5 Canal NRBC, no qual os eritroblastos são diferenciados de leucócitos e de estromas de eritrócitos por análise dos *clusters*, baseada na intensidade de fluorescência e na dispersão frontal de luz, após lise dos eritroblastos e interação das células com um corante fluorescente. Eritroblastos são menos fluorescentes e dispersam menos luz do que leucócitos. A persistência de eritroblastos no sangue periférico após transplante de células-tronco foi descrita como significativa de pior prognóstico [104].
- 6 Canal IMI, no qual precursores granulocíticos e células presumidas como primitivas da hematopoese (HPC) diferenciam-se dos leucócitos maduros pela análise de *clusters* por impedância e corrente de radiofrequência após lise diferencial. A contagem absoluta de HPC mostrou-se uma determinação clínica útil na determinação do momento ótimo para a colheita de células-tronco no sangue periférico; como a contagem de HPC é rápida e econômica, pode ser usada

para prever quando é vantajoso fazer a determinação mais lenta e dispendiosa de células CD34+ [105]. Note-se que retardo na execução faz diminuir apreciavelmente a contagem, por exemplo, cerca de 50% após 3 horas [106]. *Flags* para células anormais são gerados pela integração de informações do canal de fórmula diferencial e do canal IMI.

- 7 Canal de reticulócitos (com o instrumento no módulo reticulócitos), no qual as plaquetas são também identificadas opticamente e é feita uma contagem de plaquetas imaturas ("plaquetas reticuladas") por método óptico-fluorescente; o corante fluorescente é uma mistura patenteada de polimetina e oxazina. O canal de reticulócitos também pode ser usado para contar e monitorizar fragmentos eritrocitários, pelo reconhecimento de partículas menores do que eritrócitos, com um conteúdo de RNA inferior ao das plaquetas, em pacientes com anemia hemolítica microangiopática [107, 108]. Há boa correlação com a contagem ao microscópio [107], mas as contagens devem ser feitas prontamente porque a fragmentação aumenta com o armazenamento do sangue [107]. O valor "normal" para fragmentos de eritrócitos é de < 0,5%, com valores < 1% mostrando alto valor preditivo negativo [108]. Este canal também mede o conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos, Ret-He (estimado a partir da dispersão de luz, RET-Y), que diminui ao iniciar-se deficiência funcional de ferro e responde rapidamente à reposição terapêutica. Também diminui rapidamente em pacientes hospitalizados com pneumonia, sendo sinal precoce da diminuição da síntese de hemoglobina decorrente da inflamação [109]. A Ret-He, produzida por transformação da RET-Y e expressa em pg, fornece informação precoce, similar à da CHR dos instrumentos Siemens, na deficiência de ferro e na eritropoese com restrição de ferro, como é o caso da deficiência funcional de ferro de pacientes em hemodiálise ao receberem eritropoetina [110, 111]. A Ret-He foi incorporada em um algoritmo para diagnóstico diferencial das anemias microcíticas [112]. As generalidades da contagem de reticulócitos já foram discutidas neste capítulo.

A contagem de plaquetas reticuladas (IPF) reflete a atividade trombocitopoética, correlacionando-se inversamente com a contagem de plaquetas na púrpura trombocitopênica autoimune; é baixa na anemia aplásica. Um aumento na IPF% é preditivo da

recuperação da medula óssea após quimioterapia [113]. A IPF% também aumenta nas doenças hepáticas, mas, quando expressa como uma contagem de plaquetas reticuladas em número absoluto (/ μ L), diminui em pacientes com cirrose hepática em comparação com pacientes com esteatose e com pessoas saudáveis, indicando diminuição da produção de plaquetas [114]. A IPF pode estar inapropriadamente aumentada nas SMDs [115].

Sysmex XE-2100D

Este modelo mais simples difere do XE-2100 por não fornecer contagem de eritroblastos, contagem de reticulócitos e IMI. Fornece apenas um hemograma com diferencial de 5 partes. O VPM varia com o método de determinação: tanto em pessoas saudáveis como nos pacientes, os valores médios obtidos no XE-2100D são significativamente mais altos do que os do Coulter LH 750, o qual, por sua vez, fornece valores mais altos que o Advia 2120 [62].

Sysmex XE-5000

Introduzido em 2007, é o sucessor do XE-2100. As funções adicionais, em relação ao modelo anterior, são: medida da concentração e conteúdo hemoglobínico dos eritrócitos individualmente, permitindo o cálculo da porcentagem de células hipocrômicas (com hemoglobina < 17 pg, %Hypo-He) e da porcentagem de células hiperocrômicas (%Hyper-He); estimativa da porcentagem de micrócitos com volume < 60 fL (%Micro-R) e de macrócitos com volume > 120 fL (%Macro-R). A %Micro-R é maior na talassemia menor do que na anemia ferropênica, leve ou moderada, enquanto a fração reticulocítica imatura é mais baixa – mas ainda acima da normal [116]. A subtração (%Micro-R) – (%Hypo-He) mostrou-se útil na distinção entre talassemia menor e deficiência de ferro em pacientes com anemia moderada: um valor acima de 11,5 é fortemente sugestivo de talassemia [117]. Em outro estudo, a subtração (%Micro-R) – (%Hypo-He) – RDW, com um *cut off* de -7,6, mostrou-se ainda mais sensível [118]. Ret-He e %Hypo-He mostraram-se úteis, em pacientes em hemodiálise recebendo eritropoetina, para prever os que vão responder à ferroterapia [119]; a utilidade foi similar às medidas similares dos instrumentos Siemens. O Sysmex XE-5000 conta eritrócitos fragmentados (FRCs); há boa correlação com contagens ao microscópio, mas com certa superestimação de parte do instrumento, particularmente quando há hipocromia [120]. Os algoritmos para *flagging* de células anormais, como *blast cells*, *abnormal lymphocytes/lymphoblasts*, ou *atypical*

lymphocytes, foram melhorados no Sysmex XE-5000 [121]. Em um trabalho, mostraram menos resultados falso-positivos do que o XE-2100, sem aumento dos falso-negativos, tendo reduzido o número de hemogramas com indicação de microscopia [121]; no mesmo estudo, o número de *flags* falso-positivos para eritroblastos (NRBC) mostrou-se aumentado, mas diminuiu ao repetir-se a passagem das amostras na máquina. Entretanto, em outro trabalho em que foram comparados três instrumentos XE-5000, a reprodutibilidade do *flag blast cells* foi pobre; a sensibilidade também foi baixa, havendo casos falso-negativos principalmente em amostras leucopênicas [122]. Baixa sensibilidade a blastos em leucopenias foi confirmada em outro estudo de três instrumentos; foi sugerida a baixa dos limiares para *flagging* e a revisão ao microscópio de amostras com contagem de leucócitos $< 2.000/\mu\text{L}$ [123].

Série Sysmex XN

É a sucessora do XE-5000. As modificações incluem: uso de cinco corantes fluorescentes em cinco diferentes canais; introdução de um canal para células nucleadas que inclui leucócitos e eritroblastos (WNR) de modo que não há um canal separado de NRBC; um canal diferencial para leucócitos melhorado (WDF) de modo a dispensar o canal separado para basófilos; um canal para leucócitos precursores (WPC), que é usado para um teste secundário automático quando há *flag blast/abnormal lymphocytes*, e um canal fluorescente adicional para plaquetas (PLT-F), que incorpora um corante de RNA fluorescente e permite a estimativa da IPF, em teste secundário automático, quando há histogramas anormais de eritrócitos ou plaquetas, e que permite uma extensão da contagem de plaquetas quando há trombocitopenia abaixo de um nível predeterminado. Granulócitos imaturos também são contados.

Na avaliação comparativa com o Sysmex XE-2100, foram feitas as seguintes observações: a contagem de eritroblastos é feita em todas as amostras; *flags* positivos para blastos, linfócitos anormais e linfócitos atípicos são menos frequentes, sem aumento de falso-negativos. A necessidade de revisão microscópica diminuiu em 49%; há um módulo prolongado para contagem de leucócitos, para maior precisão da fórmula diferencial, a ser usado quando há leucopenia abaixo de $500/\mu\text{L}$; a duração média dos procedimentos melhorou 10% [124]. Em comparação com o Beckman-Coulter DxH 800 e o Cell-Dyn Sapphire, o modelo XN-2000 mostrou-se mais sensível na detecção de células anormais, incluindo blastos e eritroblastos [125].

Sysmex XT-2000i

É um instrumento compacto, combinando método óptico e de impedância, apropriado para laboratórios pequenos [126]. Tem três detectores para dispersão de luz frontal, dispersão lateral e fluorescência, que são a base de uma contagem diferencial em cinco partes, feita após coloração com um corante de polimetina. Eritrócitos e plaquetas são contados por impedância. A contagem de reticulócitos é feita em módulo suplementar, após coloração do RNA com polimetina; este módulo também fornece uma contagem óptica de plaquetas.

Informações sobre os instrumentos Sysmex estão disponíveis no *website* da empresa, www.sysmex.com.

Instrumentos Siemens (anteriormente Technicon, depois Bayer)

Uma célula, ao passar através de um feixe luminoso, dispersa a luz, e esta pode ser detectada por sensores fotópticos dispostos lateralmente ao feixe. O grau de dispersão relaciona-se com o tamanho celular, de modo que as células podem ser contadas e medidas. Colocando um detector frontalmente ao feixe, pode ser medida também a absorvância da luz. O feixe luminoso pode ser tanto uma luz branca como um *laser* coerente de grande intensidade, este com qualidade óptica superior. O detector pode ser tanto um fotomultiplicador como um fotodiodo; ambos convertem a luz em impulsos elétricos que podem ser acumulados e contados.

Série H.1

A série H.1 de instrumentos – H.1, H.2 e H.3 – está fora de fabricação, mas a série ulterior, agora Advia, baseia-se nos mesmos princípios. As células são contadas e medidas por dispersão de luz, luz branca para leucócitos e *laser* para eritrócitos e plaquetas. Os eritrócitos são convertidos de modo isovolumétrico em esferas, de modo que a dispersão de luz se torna independente do formato da célula, e pode ser predita por leis físicas. As células passam por um raio *laser*, e a luz dispersada frontalmente é medida em um ângulo estreito (2 a 3°) e em um mais largo (5 a 15°). A comparação de ambas permite a computadorização do tamanho e da concentração de hemoglobina das células, uma a uma. São fornecidos histogramas da distribuição das células por volume e por concentração hemoglobínica, além de um gráfico no qual o volume corpuscular é plotado na ordenada e a concentração hemoglobínica, na abscissa (Figura 2.15). O histograma dos volumes celulares individuais permite a derivação do VCM, do RDW e do Hct.

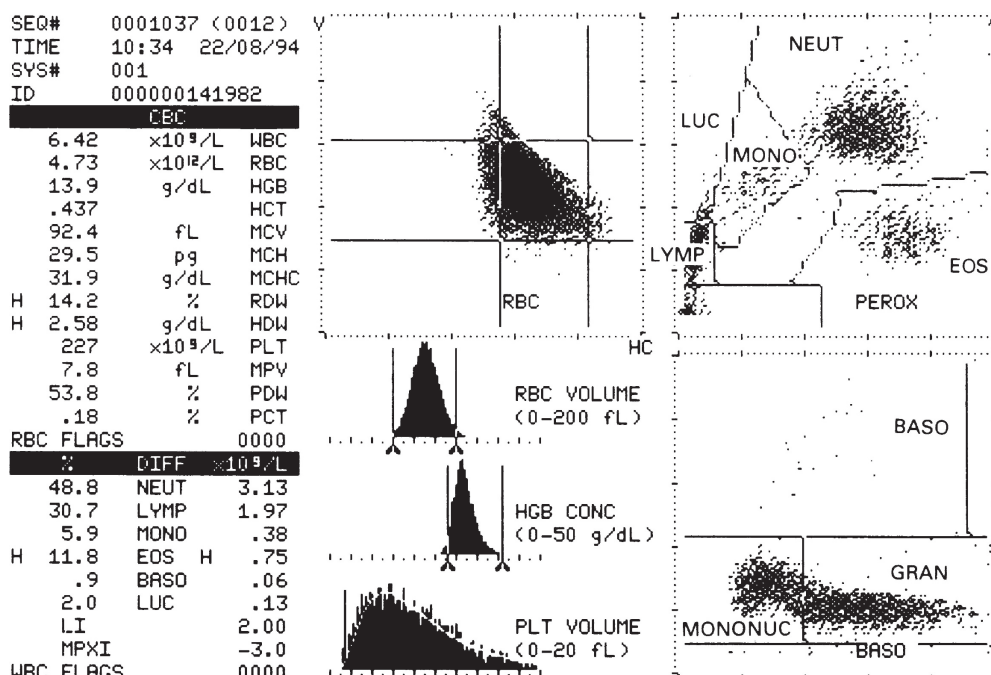


FIGURA 2.15 Histogramas e scatter plots do volume e da concentração hemoglobínica dos eritrócitos e scatter plots dos leucócitos, fornecidos por um contador Bayer-Technicon H.2. No canal peroxidase, a dispersão frontal da luz, influenciada em grande parte pelo volume celular, é plotada contra a absorvância da luz, dependendo, em grande parte, da intensidade da reação de peroxidase. Há cinco populações de leucócitos: NEUT, neutrófilos; MONO, monócitos; LYMPH, linfócitos; EOS, eosinófilos; e LUC grandes células não-coradas, que são células grandes peroxidase-negativas. No canal basófilos/lobularidade, a dispersão frontal da luz, dependente do volume celular, após a remoção citoplasmática diferencial, é plotada contra a dispersão da luz em grande ângulo, a qual é dependente, em grande parte, da estrutura celular. Há três grupos de células, dois dos quais se superpõem: BASO, basófilos; MONONUC, células mononucleares (linfócitos e monócitos); e GRAN, granulócitos (neutrófilos e eosinófilos).

Da mesma forma, o histograma das concentrações hemoglobínicas individuais permite a derivação da média das concentrações corpusculares de hemoglobina (MCCH) e da amplitude de distribuição de hemoglobina ($HDW = haemoglobin\ distribution\ width$), sendo esta última a medida da variação da concentração hemoglobínica entre as células. A Hb é dosada por uma modificação da metodologia convencional da cianometemoglobina, e a HCM e a CHCM são computadas a partir da Hb, da contagem de eritrócitos e do VCM. Também é oferecida, como opcional, uma dosagem de Hb pelo método lauril-sulfato. A MCCH e a CHCM (concentração hemoglobínica corpuscular média tradicional) são determinações obtidas independentemente, mas ambas representam a concentração média de hemoglobina em uma célula. Devem fornecer, essencialmente, o mesmo resultado. Isso serve como um mecanismo interno de controle de qualidade, pois os erros na dosagem da Hb – por exemplo, erros devidos a uma leucocitose elevada – provocam discrepância entre

as duas determinações. Seria teoricamente possível omitir o canal de hemoglobina, calculando-a a partir da MCCH, da contagem de eritrócitos e do VCM, obtidos das medidas por dispersão da luz.

A tecnologia dos instrumentos da série H.1 parece fornecer determinações exatas de VCM, Hct e CHCM, concordantes com os métodos de referência [127, 128]. Esses instrumentos conseguiram corrigir a inexatidão dos primeiros instrumentos de dispersão da luz (nos quais a dispersão luminosa era influenciada pela concentração de hemoglobina e pelo tamanho celular) e também as inerentes aos contadores por impedância (nos quais a sombra elétrica era influenciada pela deformabilidade, além do tamanho celular). Células que não podem ser convertidas em esferas isovolumétricas (p. ex., células falciformes irreversíveis), entretanto, não são medidas com exatidão. Medidas similares de dispersão da luz em dois ângulos permitem contar e medir as plaquetas (contagem de plaquetas e VPM); também são computados o plaquetócrito e o PDW.

A contagem por essa tecnologia, principalmente quando há trombocitopenia, parece melhor do que a contagem por impedância (Coulter ou Sysmex) [27]. O VPM diminui com o armazenamento do sangue.

A detecção de eritrócitos hipocrômicos por esses instrumentos correlaciona-se com a observação de hipocromia ao microscópio. A porcentagem de eritrócitos hipocrômicos está aumentada na falta de ferro e na anemia das doenças crônicas, e é muito sensível na detecção de deficiência funcional de ferro em pacientes recebendo eritropoetina, como é o caso de pacientes em hemodiálise. Alterações similares foram notadas em voluntários saudáveis, repletos de ferro, tendo-se sugerido utilizar tal medida na detecção do uso ilícito de eritropoetina por atletas [129]. Em pacientes hospitalizados, entretanto, um aumento da porcentagem de eritrócitos hipocrômicos mostrou baixa especificidade para a deficiência de ferro [130]. Macrócitos hipocrômicos têm significação diferente: indicam diseritropoese ou reticulocitose.

O citograma eritrocítico tem utilidade diagnóstica (ver Capítulo 8).

A contagem diferencial da série H.1 deriva de dois canais (ver Tabela 2.6). O canal peroxidase utiliza luz branca, incorporando uma reação citoquímica na qual a peroxidase dos neutrófilos, dos eosinófilos e dos monócitos age sobre um substrato, o 4-cloro-1-naftol, produzindo um produto de reação negro, que absorve luz. A dispersão da luz, proporcional ao tamanho da célula é, então, plotada contra a absorvância da luz, proporcional à intensidade da reação de peroxidase (ver Figura 2.15). Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos dividem-se em quatro *clusters*, separados entre eles e dos restos celulares por uma combinação de limiares fixos e móveis. Há outro *cluster* de células peroxidase-negativas e maiores do que a maioria dos linfócitos, denominadas células grandes não coradas (LUCs – *large unstained cells*). Em pessoas saudáveis, as LUCs são principalmente linfócitos grandes, mas células anormais, como blastos, linfócitos atípicos, células linfomatosas, células pilosas (*hairy cells*), plasmócitos e neutrófilos peroxidase-negativos podem alocar-se nessa área. No canal de peroxidase, os basófilos caem na área dos linfócitos. Os basófilos são distinguidos dos demais leucócitos em um canal independente (canal basófilo/lobularidade), pela resistência à perda do citoplasma frente a um agente lítico em meio ácido. Os basófilos, medidos por dispersão frontal da luz, são maiores do que os resíduos sem citoplasma das demais células (ver Figura

2.15). Também se utiliza o canal basófilo/lobularidade para detectar a presença de blastos. A dispersão frontal da luz, proporcional ao tamanho celular, é plotada contra a dispersão da luz em grande ângulo, que é uma medida do aumento da densidade nuclear e da lobulação. Os blastos são detectados como uma população com densidade nuclear anormalmente baixa. Além disso, o “índice de lobularidade” (LI) é uma determinação da relação entre o número de células que produzem muita dispersão da luz em ângulo grande (neutrófilos lobulados) e as células que produzem menos dispersão da luz em ângulo grande (células mononucleares, granulócitos imaturos e blastos).

Os instrumentos da série H.1, além de *flags* para a presença de blastos, linfócitos atípicos, granulócitos imaturos e eritroblastos, fornecem dois novos parâmetros leucocitários – LI (já descrito) e índice médio de peroxidase (MPXI). Este último é uma medida da atividade média da peroxidase, a qual está diminuída na deficiência genética de peroxidase e também na deficiência adquirida, como a que ocorre em algumas SMDs e leucemias mieloides; há uma diminuição na gravidez, com nadir na vigésima semana [131]. O MPXI está aumentado nas infecções, em algumas leucemias mieloides e SMDs, na aids e na anemia megaloblástica.

O instrumento Siemens ulterior, o Advia 120, opera nos mesmos princípios que os da série H.1. O número total de células nucleadas, entretanto, é fornecido pelo canal basófilos/lobularidade em vez de pelo canal peroxidase. Há uma melhoria da análise dos *clusters* no canal basófilos/lobularidade, permitindo um melhor *flagging* para eritroblastos (Figuras 2.16 e 2.17). A contagem de plaquetas origina-se de análise bidimensional de tamanho e índice de refração, usando dispersão de *laser* em dois ângulos; o resultado é mais acurado do que o obtido com o H.3 [132]. Os *flags* leucocitários são: ATYPS, NRBC, BLASTS, LS (*left shift* = desvio à esquerda) e IG. Os eritrocíticos são: MICRO, MACRO, ANISO, HYPER, HYPO, HCVAR, RBCF (fragmentos de eritrócitos) e RBCG (estromas de eritrócitos). Há um maior número de parâmetros plaquetários: concentração média de componentes plaquetários (MPC), amplitude de distribuição dos componentes plaquetários (PCDW), massa plaquetária média (MPM) e amplitude de distribuição da massa plaquetária (PMDW). Estromas e fragmentos de eritrócitos são separados das plaquetas e de eritrócitos íntegros com base no tamanho e no índice refrativo. Já foram publicados valores de referência e sugeriu-se que a MPC possa ser um indicador útil de ativação

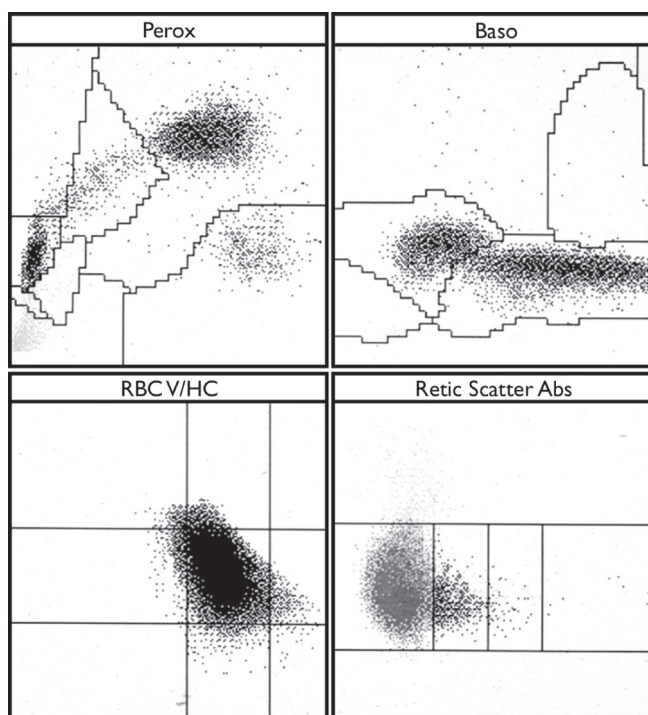


FIGURA 2.16 Scatter plots produzidos pelo Siemens Advia 120 com um sangue normal, mostrando o canal de peroxidase (acima, à esquerda, Perox), o canal de basófilos (acima, à direita, Baso), o volume dos eritrócitos plotado contra a hemoglobina (abaixo, à esquerda, RBC V/HC) e o scatter plot do canal de reticulócitos (abaixo, à direita, Retic Scatter Abs). No canal Perox, a área inferior esquerda é ocupada por eritroblastos (à esquerda) e ruído (à direita), e agregados plaquetários aparecem na área à direita da caixa de linfócitos; neste canal, os basófilos localizam-se na caixa de linfócitos. Em comparação com instrumentos da série H.1, o canal de basófilos agora tem uma área de ruído (na base) e uma caixa de blastos (acima e à esquerda da caixa de ruído); a caixa prévia de basófilos é dividida em basófilos (à esquerda) e “suspeita de basófilos” (à direita); na extrema direita, uma caixa estreita é de “sinais de saturação”.

plaquetária [133]. Em trabalho comparativo entre a contagem de basófilos no Advia 120 e a contagem por citometria em fluxo, foi notada uma correlação pobre, com coeficiente de correlação 0,24, melhorando para 0,57 ao serem retiradas as amostras com *flags* para anormalidades leucocitárias [103]. Pseudobasofilia foi notada em 4/112 amostras [103]. A correlação foi pior do que a observada no Cell-Dyn Sapphire e no Sysmex XE-2100 [103]. Em comparação com outros três instrumentos, a sensibilidade do *flag blasts* do Advia 120 (71%) foi inferior à do XE-2100 e à do DxH 800, e a especificidade foi a menor dos quatro [134]. O *cluster LUC* não se mostrou útil para prever números de células hematopoéticas progenitoras [135].

O mais recente instrumento desta série é o Advia 2120, que incorpora um método de dosagem de hemoglobina isento de cianeto, contagem de eritroblastos, correção do CTCN para contagem de leucócitos e um distensor de lâminas, com ajuste automático pelo hematócrito e pela contagem de

leucócitos. A contagem de eritroblastos baseia-se em dados ao mesmo tempo da área não corada do canal de peroxidase e de uma combinação de dados do canal de peroxidase e do canal basófilo/lobularidade. Sensibilidade e especificidade para a detecção de eritroblastos foram estimadas em 77,3% e 74,6% respectivamente [136]. Um histograma plaquetário mede partículas entre 0 e 60 fL; dele, derivam VPM e PDW. O plaquetócrito – volume do sangue ocupado pelas plaquetas – é o produto do VPM pela contagem de plaquetas. Outros parâmetros plaquetários são: o MPC, derivado do histograma do componente plaquetário (0-40 g/dL), que reflete a densidade das plaquetas; o LPLT, contagem de plaquetas > 20 fL, e a porcentagem destas (LPLT%). O VPM e o MPC aumentam com o armazenamento do sangue além de 3½ horas. Em pacientes com leucemia aguda ou suspeita de coagulação intravascular disseminada, a contagem de plaquetas no Advia 2120 mostra boa correlação com o método internacional de referência, sem qualquer erro sistemático;

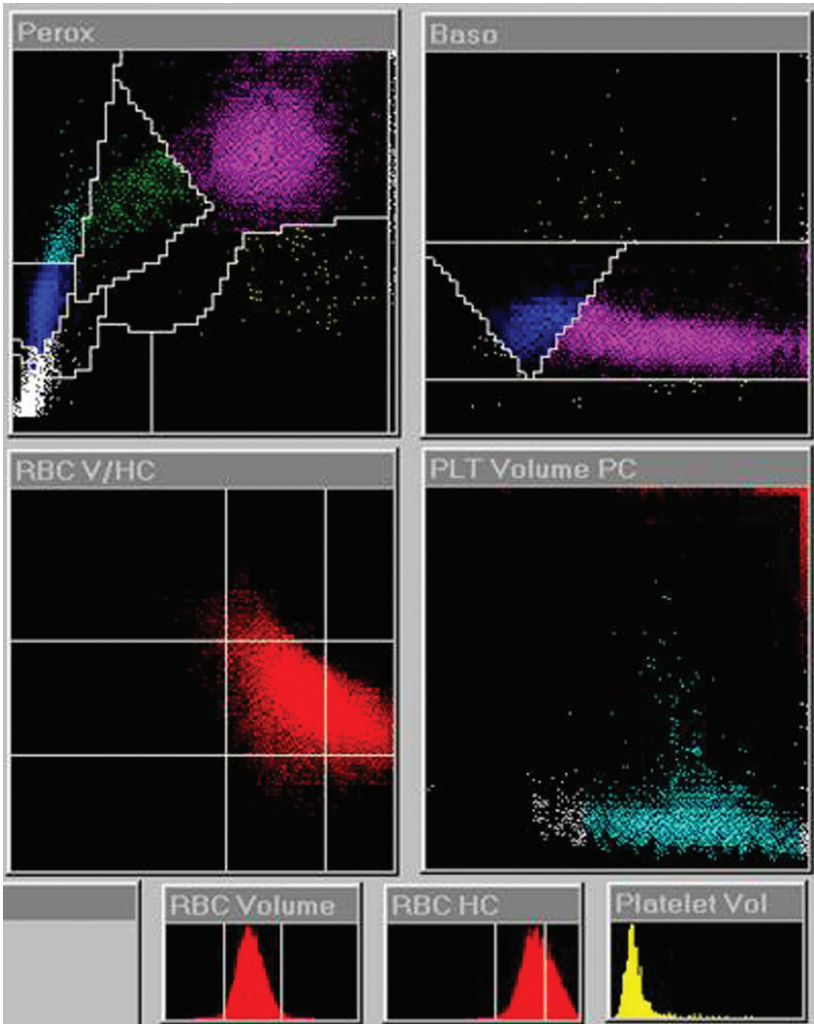


FIGURA 2.17 Scatter plots e histogramas produzidos pelo Siemens Advia 120 em amostra de sangue de paciente com esferocitose hereditária, mostrando o canal de peroxidase (acima, à esquerda, Perox), o canal de basófilos (acima, à direita, Baso), os eritrócitos plotados com volume na ordenada contra concentração de hemoglobina na abscissa (centro, à esquerda, RBC V/HC) e as plaquetas plotadas com volume na ordenada contra índice de refração, proporcional ao “componente plaquetário” (PC) na abscissa (centro, à direita, PLT Volume PC). Na base, estão os histogramas de volume corpuscular, concentração hemoglobínica corpuscular (HC) e volume plaquetário. Notar a presença de uma população de eritrócitos hiperdensos constituída de esferócitos, tanto no gráfico RBC V/HC (cauda no retângulo central direito) como no histograma de hemoglobina corpuscular, em ambos ultrapassando o limiar de 42 g/dL. O eritrograma mostrou: E = 3,55 M/ μ L; Hb = 10,9 g/dL; Hct = 32%; VCM = 89,2 fL; HCM = 30,8 pg; CHCM = 34,6 g/dL; MCCH = 39,6 g/dL. Cortesia da Professora Gina Zini, Roma.

contagens erradas são mais prováveis quando há ativação plaquetária [61]. Fragmentos de eritrócitos são detectados e quantificados no canal de plaquetas, com base em tamanho < 30 fL e índice de refração > 1,4; o valor “normal” é < 0,3% e quando < 1% o dado tem alto valor preditivo negativo [108]. Elevação espúria da contagem de eritrócitos fragmentados pode decorrer da presença de micrócitos muito pequenos [108]. Há quatro *flags* para a

presença possível de blastos – *blast*, “*basophil-no valley*”, *ATYP* e *LUC*; no conjunto, mostraram-se mais sensíveis (mas menos específicos) do que os *flags* para blastos do Beckman-Coulter LH 750 [58]. A CHret e a HYPO% mostraram-se úteis em pacientes em hemodiálise recebendo eritropoetina para selecionar os que responderiam a tratamento com ferro [119]. A contagem absoluta de neutrófilos do Advia 2120i mostrou-se acurada e reprodutível, mesmo

quando muito baixa [102]. Em pacientes HIV-positivos assintomáticos, houve aumento de LUC.

Informações sobre os instrumentos Siemens estão disponíveis no *website* da empresa, www.healthcare.siemens.com.

Instrumentos Abbott (Cell-Dyn)

Cell-Dyn 3500

O Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics) é um instrumento automatizado de múltiplos canais que utiliza tanto a dispersão de *laser* quanto a tecnologia de impedância. A Hb é determinada como cianometemoglobina. Os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas são contados e medidos por impedância, depois da remoção do citoplasma dos leucócitos. São fornecidos histogramas da distribuição por volume celular (Figura 2.18).

A contagem de leucócitos também é feita por um canal de dispersão de *laser* que fornece, além disso, uma fórmula leucocitária automatizada em cinco partes [137] (ver Tabela 2.6). Os leucócitos, praticamente íntegros, são dirigidos hidrodinamicamente para passarem em fila única através do feixe *laser*. Nesse canal, os eritrócitos tornam-se transparentes, porque seu índice de refração é o mesmo do reagente da bacia de fluido. São analisados quatro parâmetros de dispersão luminosa:

- 1 Dispersão luminosa frontal a 1 a 3° (referida como dispersão a 0°), dependente principalmente do tamanho celular.
- 2 Dispersão luminosa em ângulo estreito, de 7 a 11° (chamado de dispersão a 10°), dependente da estrutura e da complexidade celular.
- 3 Dispersão ortogonal de luz totalmente polarizada a 70 a 100° (chamada de dispersão a 90°).

- 4 Dispersão ortogonal de luz despolarizada a 70 a 100° (chamada de dispersão a 90°D).

São fornecidos *scatter plots* das populações de leucócitos (Figura 2.19). As células são inicialmente separadas em granulócitos e células mononucleares (Figura 2.19a), com base na lobularidade e na complexidade. Em seguida, os granulócitos são separados em eosinófilos e neutrófilos, com base na capacidade única dos eosinófilos de despolarizarem a luz (Figura 2.19b). Depois, as células mononucleares são separadas em monócitos, linfócitos e basófilos degranulados (os grânulos basófilos são solúveis no reagente da bacia fluida), com base no tamanho e na complexidade celulares (Figura 2.19c). Finalmente, são indicadas as cinco populações (codificadas pela cor) em plotagem da lobularidade contra o tamanho (Figura 2.19d). Grupos de células com características anômalas geram alarmes para blastos, linfócitos atípicos, eritroblastos e granulócitos imaturos.

A contagem de leucócitos por duas tecnologias serve como um mecanismo interno de controle de qualidade.

A contagem no canal de impedância (WIC) é falsamente elevada quando houver eritroblastos, enquanto a contagem no canal óptico (WOC) exclui os eritroblastos por meio de um limiar móvel. Contudo, como o canal óptico emprega um agente lítico menos potente, a WOC pode ser falsamente elevada quando houver eritrócitos osmoticamente resistentes, conforme ocorre em algumas amostras de sangue neonatal. Há *flag* sobre a probabilidade de eritrócitos nucleados ou osmoticamente resistentes, e um algoritmo seleciona o resultado preferido. Se houver alarme simultâneo para ambos, o operador pode selecionar um maior tempo de lise para obter uma WOC exata.

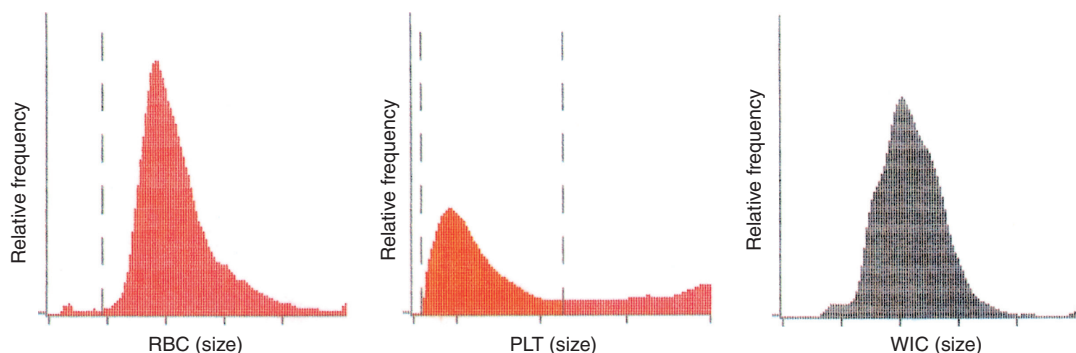


FIGURA 2.18 Resultado do contador automatizado Cell-Dyn 3500, mostrando histogramas de distribuição de volume dos eritrócitos (RBC), das plaquetas (PLT) e dos leucócitos, derivados do canal de impedância (WIC).

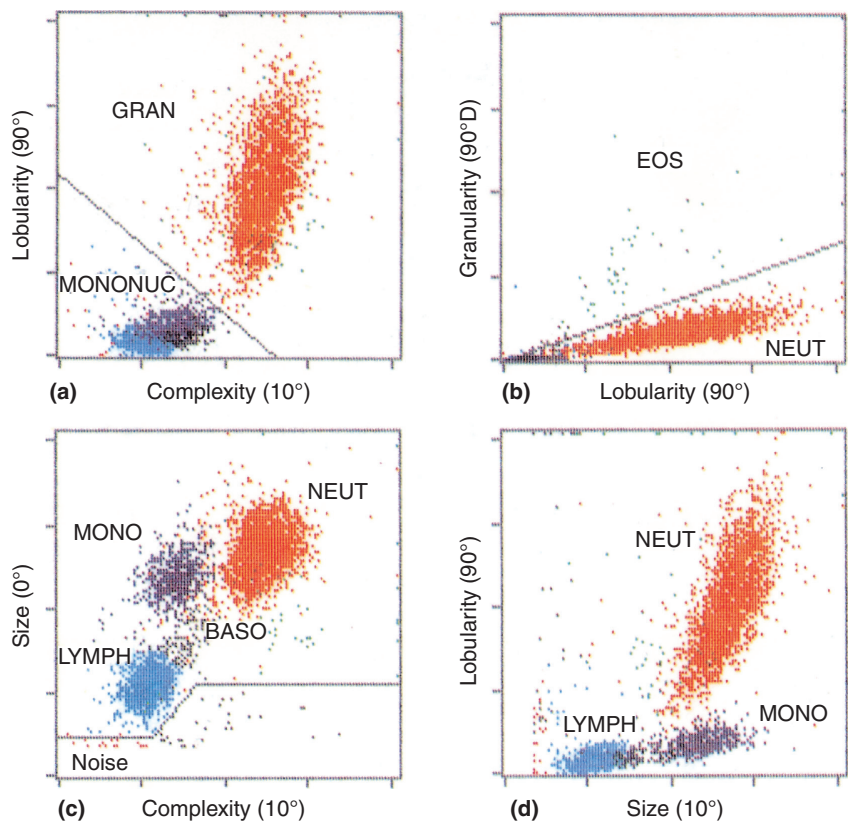


FIGURA 2.19 Resultado de um contador Cell-Dyn 3500 mostrando os *scatter plots* de leucócitos derivados do canal óptico de leucócitos. (a) A plotagem da dispersão a 90° (indicando lobularidade) contra a dispersão a 10° (indicando complexidade) separa um grupo de granulócitos de um de mononucleares. (b) A dispersão a 90°D (despolarizada) contra a dispersão a 90° separa o grupo de granulócitos em eosinófilos (que despolarizam a luz) e neutrófilos (que não o fazem). (c) A dispersão a 0° (relacionada com a complexidade) separa o grupo de células mononucleares em linfócitos, monócitos e basófilos degranulados. (d) As cinco populações assim identificadas são apresentadas em uma plotagem de dispersão a 90° (relacionada com a lobularidade) contra dispersão a 0° (relacionada com o tamanho). GRAN, granulócitos; MONONUC, células mononucleares; NEUT, neutrófilos; MONO, monócitos; LYMPH, linfócitos; EOS, eosinófilos.

Cell-Dyn 4000

O Cell-Dyn 4000 incorpora, a mais que o Cell-Dyn 3500, contagem automática de reticulócitos e de eritroblastos [138, 139]. Reticulócitos são identificados pela análise de dispersão da luz em dois ângulos pequenos e pela fluorescência verde, decorrente da interação com o corante de DNA-RNA, CD4K530, e são diferenciados das plaquetas, dos núcleos de leucócitos e dos corpos de Howell-Jolly. Eritroblastos são permeabilizados e reconhecidos após interação com um corante fluorescente de DNA-RNA, o iodo de propídio, por três medidas, duas de dispersão de luz relacionadas ao tamanho celular, e pelo sinal de fluorescência vermelha, derivado dos núcleos de eritroblastos e de leucócitos lesionados; são diferenciados das plaquetas, dos corpos de Howell-Jolly e do

pontilhado basófilo. Como os eritroblastos têm uma contagem própria, o Cell-Dyn 4000 produz uma contagem de leucócitos em vez de uma contagem de células nucleadas totais. Fornece, também, uma estimativa do grau de confiança para o alarme *blasts*, de utilidade clínica [140]. Incorpora, ainda, um alarme para “leucócitos não viáveis”, que alerta o operador para amostras envelhecidas pela conservação [139], ou patológicas, pela presença de número significativo de células apoptóticas. Há um alarme para linfócitos atípicos, comprovadamente sensível embora pouco específico [141]. O Cell-Dyn 4000 pode ser usado para a contagem imunológica de plaquetas, empregando um anticorpo monoclonal fluorescente CD61 [142]. É um método caro, para conferir contagens muito baixas, não para a rotina; deve ser

indicado quando o número de plaquetas se aproximar do limite indicativo da necessidade de transfusão de plaquetas (p. ex., < 20.000 ou $< 10.000/\mu\text{L}$), quando houver plaquetas gigantes, fragmentos de eritrócitos ou microcitose extrema [143]. O instrumento tem a possibilidade de estender o período de lise quando os eritrócitos estiverem incompletamente lisados e também um módulo de extensão do tempo de contagem para amostras citopênicas. O Cell-Dyn 4000 também pode ser usado para a contagem de linfócitos T, B e células *Natural Killer* (NK) [144] e para a quantificação de eritrócitos Rh-positivos fetais na circulação de mãe Rh-negativa – para isso, incubava-se o sangue materno com um anticorpo monoclonal anti-D conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) [145].

Os instrumentos Cell-Dyn costumam mostrar aspectos anormais em alguns pacientes com malária falcípara ou vivax, pela despolarização da luz pelo pigmento malárico (hemozoína) [146], o que pode servir de alerta para o pessoal do laboratório quanto a este diagnóstico; em um trabalho, a detecção foi negativa apenas em 1 caso em 10 [147].

O Cell-Dyn 3500 e o Cell-Dyn 4000 atualmente estão fora da linha de produção da Abbott, substituídos pelos modelos discutidos a seguir.

Cell-Dyn Ruby

O Abbott Cell-Dyn Ruby é um instrumento totalmente óptico, incorporando quatro detectores para luz polarizada e despolarizada [126]. Faz uma fórmula diferencial de cinco partes. Contagem de reticulócitos opcional pode ser obtida com uma coloração, fora do sistema, com novo-azul-de-metileno. Há dois módulos suplementares adicionais, um recomendado para leucócitos frágeis, e outro, para eritrócitos resistentes à lise.

Cell-Dyn Sapphire

O Abbott Cell-Dyn Sapphire fornece um hemograma completo com fórmula diferencial de cinco partes, com contagem de eritroblastos e contagem de reticulócitos opcional. Ele incorpora quatro detectores ópticos para luz polarizada e despolarizada e três detectores de fluorescência. O tipo de *laser* e os reagentes diferem dos usados nos instrumentos anteriores, mas os princípios são os mesmos. Eritroblastos são contados após coloração com o fluorocromo iodeto de propídio, o que permite simultâneo fornecimento de um índice de viabilidade para os leucócitos. A contagem de eritroblastos mostrou-se mais acurada do que a do LH 780 e do DxH 800 [79]. Testes opcionais são contagem

imunológica de plaquetas (com anticorpo monoclonal CD61) e determinação de linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ (com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo). Em pacientes com leucemia aguda ou suspeita de coagulação intravascular disseminada, as contagens de plaquetas pelos três métodos mostram boa correlação com o método de referência internacional, mas a inclinação da linha de regressão indica subestimação da contagem [61]; para o método óptico, há mais probabilidade de obter-se contagens erradas quando há ativação plaquetária, que faz com que percam os grânulos. Os eritrócitos são contados por método óptico e de impedância; a hemoglobina é dosada por química com um ligante de imidazol. Novos parâmetros eritroides incluem: %MIC (eritrócitos < 60 fL), %MAC (eritrócitos > 120 fL), %HPO (eritrócitos com concentração hemoglobínica < 28 g/dL), %HPR (eritrócitos com concentração hemoglobínica > 41 g/dL) e HDW. Novos parâmetros reticulocíticos incluem VCMr (volume corpuscular médio dos reticulócitos), HCMr (hemoglobina corpuscular média dos reticulócitos) e CHCMr (concentração hemoglobínica corpuscular média dos reticulócitos). Todos esses parâmetros mostram boa correlação com seus equivalentes dos instrumentos Siemens, mas há diferença nos valores médios, o que exige valores de referência específicos para cada linha de instrumentos [148]. Os parâmetros eritrocíticos e reticulocíticos não são necessariamente estáveis com a conservação das amostras; HCM e MCHr são estáveis, mas em 24 horas há aumento dos volumes celulares médios (VCM e MCVr) o que causa aumento de %HPO e diminuição de CHCM, CHCr e %HPR [148]. Em um trabalho de comparação da contagem de basófilos de três instrumentos com um método de citometria em fluxo, o Cell-Dyn Sapphire mostrou-se mais acurado do que o Sysmex XE-2100 e o Siemens Advia 120; mesmo assim, não houve uma correlação perfeita, com coeficiente de correlação de 0,81 ou 0,87 quando foram excluídas amostras com *flags* para leucócitos anormais [103]. Pseudobasofilia foi notada em 4/112 amostras [103]. O *flag* para blastos do Cell-Dyn Sapphire mostrou-se menos sensível do que os de outros três instrumentos, 65% contra 71-94%, mas a especificidade foi a mais alta [134].

Como os instrumentos que o precederam, o Sapphire pode mostrar resultados de polarização atípicos em casos de malária, pois o pigmento hemozoína compartilha com os eosinófilos a habilidade de despolarizar a luz; os sinais atípicos ocorrem

no *scatter plot* de neutrófilos eosinófilos em posição distinta aos sinais gerados pelos grânulos dos eosinófilos.

Cell-Dyn Emerald

É um instrumento pequeno, próprio para colocar sobre o balcão, que fornece 18 parâmetros, incluindo RDW, VPM e uma fórmula diferencial de três partes; pode ser usado para exames junto ao paciente [149]. As determinações são feitas por impedância e a Hb é dosada com reagente sem cianeto. Uma amostra de sangue muito pequena é suficiente.

Informação sobre os instrumentos Abbott estão disponíveis no *website* da empresa, www.abbottdiagnostics.com.

Instrumentos Horiba ABX

Os instrumentos Horiba, como o ABX Pentra DX 120 e o Pentra DX Nexus (Horiba ABX Diagnostics), são analisadores hematológicos que evoluíram dos instrumentos Helios Argos. Eritrócitos, leucócitos e plaquetas são contados e medidos por tecnologia de impedância; são fornecidos histogramas da distribuição de volume. O Hct é determinado pela integração da amplitude dos sinais elétricos gerados pelos eritrócitos, com correção da coincidência. As plaquetas são diferenciadas dos eritrócitos por um limiar flutuante entre 18 e 25 fL. A hemoglobina é dosada por cianometemoglobina ou por oxidação do ferro do heme, seguida por estabilização para produção de substâncias cromogênicas passíveis de dosagem. Uma contagem diferencial de cinco partes baseia-se em dois canais no Pentra DX 120 (ver Tabela 2.6). Em um canal, após interação das células com negro-clorazol E (o princípio ativo do Sudan black B), são feitas determinações de absorvância e impedância (Figura 2.20). O corante cora intensamente os grânulos dos eosinófilos, um pouco menos os dos neutrófilos e fracamente os dos monócitos; a absorvância de luz das células coradas é determinada pela intensidade de coloração dos grânulos e pelo grau de complexidade do núcleo. Em um segundo canal, os basófilos, após desnudamento diferencial do citoplasma, são diferenciados dos demais leucócitos por medidas de impedância. As diversas populações de leucócitos são dispostas em gráfico correlacionando absorvância luminosa contra impedância e são identificadas por análise dos *clusters* (com limiares móveis). São enumeradas três outras populações de leucócitos, quando presentes. “Linfócitos atípicos” são contados separadamente, mas também são incluídos na contagem total de linfócitos (ao contrário dos instrumentos Siemens,

em que as “células grandes não coradas” são contadas separadamente e excluídas da contagem de linfócitos). “Células grandes imaturas” (LICs) são contadas separadamente, mas também são incluídas na categoria de neutrófilos ou na de monócitos, dependendo da absorvância luminosa. A categoria de “linfócitos atípicos” (ATLs) pode incluir não apenas células da mononucleose infecciosa, mas também células linfomatosas, células de leucemia linfocítica crônica, blastos pequenos e plasmócitos. A categoria LIC pode incluir mieloblastos, monoblastos, promielócitos (inclusive os de leucemia promielocítica), mielócitos, metamielócitos, linfoblastos e células linfomatosas.

O Pentra DX 120 conta eritroblastos após coloração do núcleo com o corante fluorescente de ácido nucleico, tiazol-laranja. O instrumento também fornece contagem de reticulócitos, distinguindo-os em RET H, RET M e RET L (alta (*high*), média e baixa (*low*) fluorescência), MRV (volume reticulocítico médio) e RHC_C (conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos, calculado). Há *flag* para reticulócitos imaturos, granulócitos imaturos (IMG), monócitos imaturos (IMM) e linfócitos imaturos (IML).

O Pentra DX Nexus fornece uma contagem diferencial estendida que inclui IMG, IML e IMM, LIC e ATL. Eritroblastos são contados por fluorescência de tiazol-laranja e a contagem de leucócitos é corrigida. Além da contagem de reticulócitos, são fornecidos IRE, MRV e RHC_C. O RHC_C correlaciona-se com o CHr do Advia 2120 e pode ser útil na detecção de deficiência funcional de ferro.

Informações sobre os instrumentos Horiba estão disponíveis em www.horiba-abx.com.

Instrumentos Nihon Kohden

Os instrumentos Nihon Kohden, Celltac E e Celltac F, têm um canal de eritrócitos/plaquetas e um canal de leucócitos/hemoglobina. A contagem diferencial de cinco partes baseia-se em dispersão de *laser* em três ângulos: ângulo frontal baixo (tamanho celular), ângulo frontal alto (estrutura celular) e ângulo lateral (granularidade interna). Hb pode ser dosada como cianometemoglobina ou com um método isento de cianeto.

Informações estão disponíveis no *website* da empresa www.nihonkohden.com.

Instrumentos Mindray

O Mindray BC-6800 Auto Hematology Analyzer usa dispersão de *laser* em dois ângulos e sinais fluorescentes. Fornece um hemograma com fórmula diferencial de cinco partes, contagem de reticulócitos

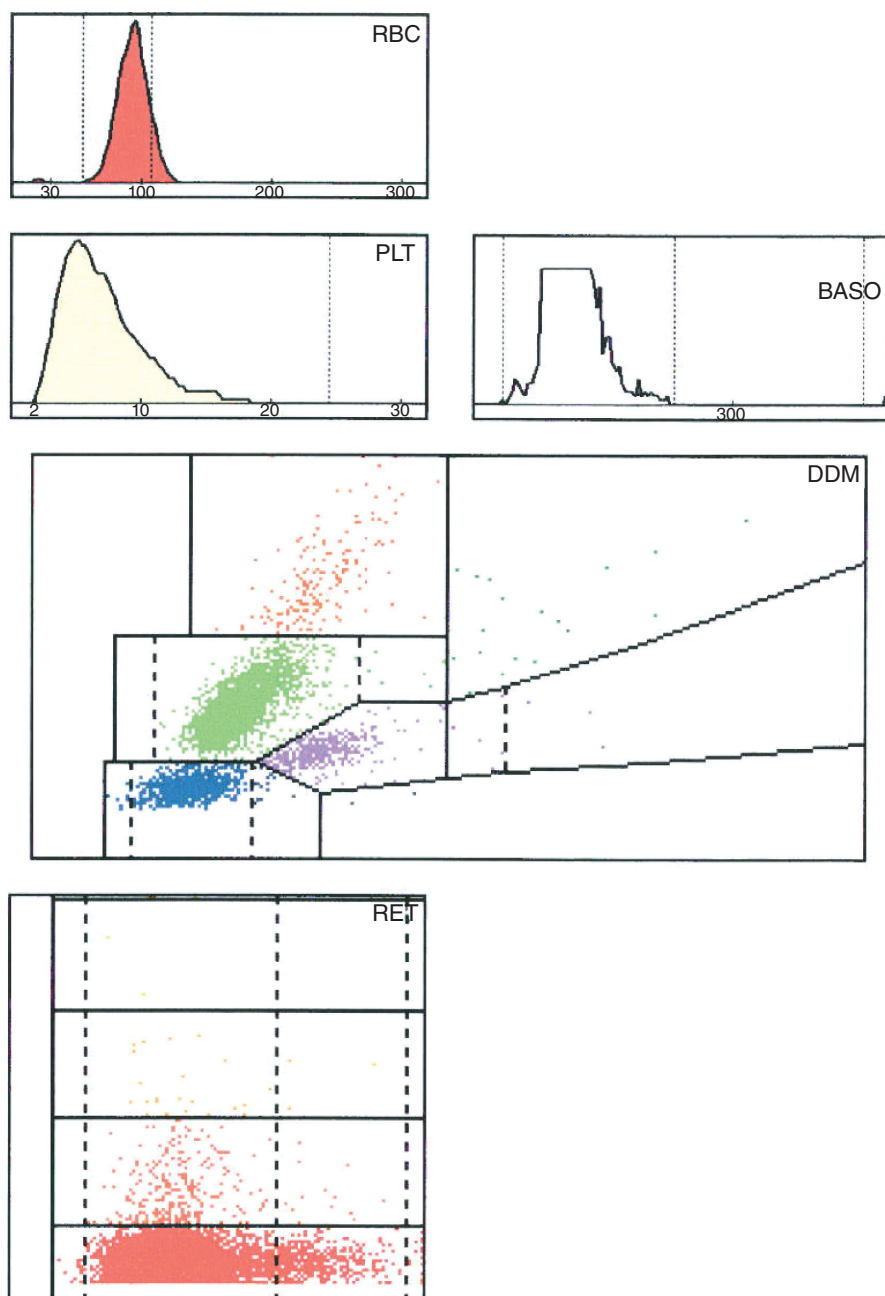


FIGURA 2.20 Histogramas da distribuição pelo tamanho dos eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT) e *scatter plots* do canal diferencial de leucócitos (DDM) e do canal de reticulócitos (RET), do analisador Horiba ABX Pentra 120.

com IRF, contagem de eritroblastos, contagem de granulócitos imaturos, contagem de células de alta fluorescência (HFCs) – linfócitos atípicos e blastos – e dois *flags*, “eritrócitos infectados?” e contagem de “InR#”, ambos para indicar a presença de parasitos da malária.

Contagens automatizadas de reticulócitos e plaquetas reticuladas

Contagem automatizada de reticulócitos

A maioria das contagens automatizadas de reticulócitos depende da capacidade de combinação de diversos fluorocromos com o RNA dos reticulócitos.

Os eritrócitos fluorescentes podem ser, então, contados em um citômetro de fluxo. Os fluorocromos também se combinam com o DNA, de modo que as células nucleadas fluorescem. Uma tecnologia alternativa baseia-se na coloração do RNA por um corante não fluorescente do ácido nucleico, como o novo-azul-de-metileno ou a oxazina 750. Os reticulócitos, então, são detectados por absorvância, dispersão da luz ou por três propriedades celulares diferentes (instrumentos Coulter). Em geral, os reticulócitos podem ser distinguidos dos leucócitos, dos eritrócitos nucleados e das plaquetas por um limiar volumétrico e por sua absorvância da luz, ou pela intensidade de fluorescência. As contagens de reticulócitos são expressas como contagem absoluta ou como porcentagem do total de eritrócitos.

Em virtude do grande número de células contadas, as contagens automatizadas de reticulócitos são muito mais reprodutíveis do que as contagens manuais. Esperava-se que também fossem mais exatas, pois é eliminado o componente subjetivo da identificação dos reticulócitos mais tardios, com apenas um ou dois grânulos de material corado. Porém, a contagem automatizada é alterada por (i) escolha do fluorocromo; (ii) tempo de exposição do sangue ao fluorocromo; (iii) temperatura em que for mantida a amostra depois da mistura; e (iv) posição dos limiares – o limiar superior, para excluir as células nucleadas fluorescentes, e o inferior, para excluir a autofluorescência de fundo.

As mesmas considerações podem ser aplicadas às contagens automatizadas de reticulócitos que empregam corantes não fluorescentes do ácido nucleico. Os limites de referência para as contagens automatizadas de reticulócitos são, portanto, específicos para o instrumento e o método, e os limites

de referência estabelecidos variam consideravelmente. A contagem manual ainda é necessária para decidir se uma variação representa “a verdade”. De maneira ideal, as contagens automatizadas e as manuais devem apresentar boa correlação, sendo as médias semelhantes e pequeno o intercepto sobre o eixo y da linha de regressão das contagens automatizadas sobre as contagens manuais.

A contagem automatizada de reticulócitos baixa com o envelhecimento do sangue *in vitro*, o que parece dever-se à maturação dos reticulócitos. Isso também ocorre com as contagens manuais, mas, pela baixa reprodutibilidade destas, a variação é pouco notada. Em sangue conservado a 4°C, a contagem é estável por 72 horas, mas, à temperatura ambiente, há baixa de 5% em 24 horas e 10% em 48 horas [150]. Idealmente, as contagens devem ser feitas dentro de 6 horas a partir da coleta.

Contagens automatizadas de reticulócitos podem ser feitas em citômetros de fluxo de uso geral, como o Becton Dickinson FACScan ou o Coulter EPICS XL, ou em um contador de reticulócitos específico, como os Sysmex R-1000, R-2000 ou R-3000 (Figura 2.21). Cada vez mais a contagem de reticulócitos está sendo incorporada aos contadores automatizados de sangue total, como o Sysmex XE-2100 (ver Figura 2.13), o Bayer H.3 e a série Advia (Figuras 2.22-2.24), o Cell-Dyn 4000 e o Sapphire, as últimas versões do Coulter STKS e do Coulter MAXM, HmX, Gen S e LH 750 e DxH 800 (Figura 2.25), e o ABX Pentra 120 e Pentra DX Nexus. A tecnologia empregada está resumida na Tabela 2.7.

Contagens automatizadas de reticulócitos variam no grau de precisão (reprodutibilidade). Uma comparação de cinco instrumentos mostrou que a menor precisão foi a do Coulter LH 750, seguida

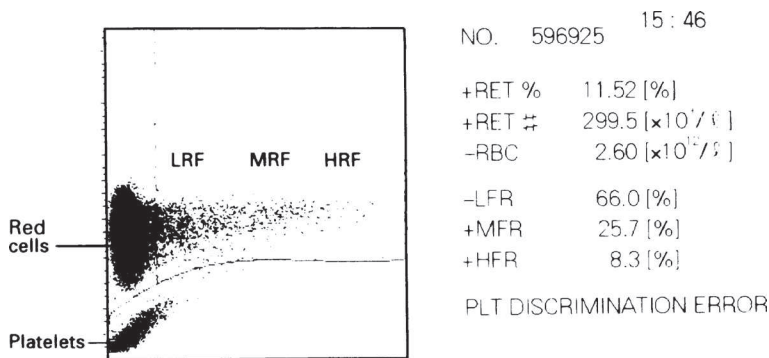


FIGURA 2.21 Scatter plot da contagem de reticulócitos do Sysmex R-3000. O volume celular é plotado contra a intensidade da fluorescência. Um limiar separa os eritrócitos das plaquetas. Os reticulócitos são divididos em alta fluorescência (HFR), representando os reticulócitos mais imaturos, fluorescência intermediária (MFR) e baixa fluorescência (LFR), representando os reticulócitos mais tardios.

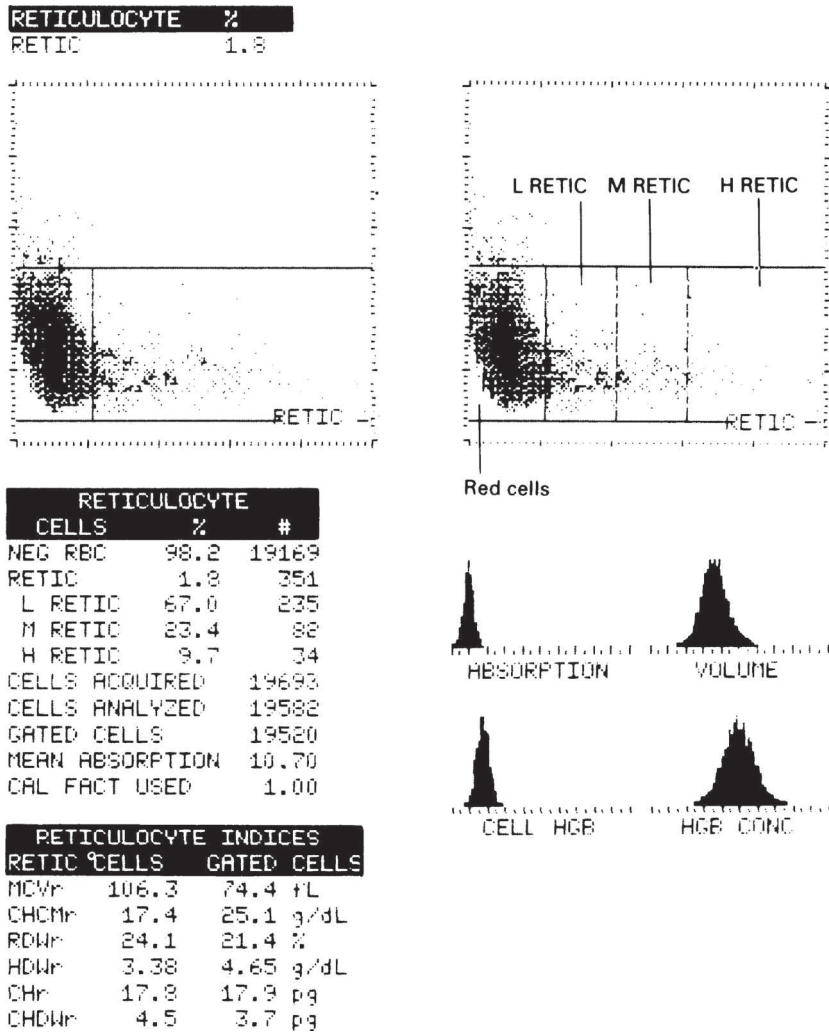


FIGURA 2.22 Resultado impresso de um contador Bayer H.3 mostrando o *scatter plot* do canal de contagem de reticulócitos. O volume e o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos e dos outros eritrócitos são determinados pela dispersão da luz em alto e em baixo ângulo, e a absorvância da luz é medida de acordo com a absorção do corante de ácido nucleico, a oxazina 750. São determinados, para os reticulócitos e também para o total de eritrócitos, seis parâmetros de possível utilidade clínica. São eles: MCV, MCCH (= CHCM), RDW, HDW (em g/dL), CH (= HCW) e o CHDW (HDW em pg). O volume celular é plotado contra a absorvância da luz. Os reticulócitos são divididos em alta absorvância (H RETIC), representando os reticulócitos mais imaturos, absorvância intermediária (M RETIC) e baixa absorvância (L RETIC), representando os reticulócitos tardios.

em ordem pela do ABX Pentra, Advia 120, Sysmex XE-2100; a do Cell-Dyn 4000 foi a maior [151]. Valores de referência são específicos para cada instrumento (ver Tabela 5.20).

Contagens automatizadas de reticulócitos também podem ser feitas pela análise de imagem em distensões coradas com novo-azul-de-metileno [152].

A contagem de reticulócitos é útil para determinar se uma anemia é causada por falta de produção na medula óssea ou por excessiva destruição periférica de

eritrócitos. Devido à maior precisão, a contagem automatizada é útil, também, para monitorizar a resposta ao tratamento com eritropoetina na insuficiência renal crônica e para detectar a recuperação da medula óssea no tratamento de anemia aplásica ou após quimioterapia para doenças malignas.

Imaturidade dos reticulócitos

Os contadores automatizados de reticulócitos também costumam fornecer índices de imaturidade

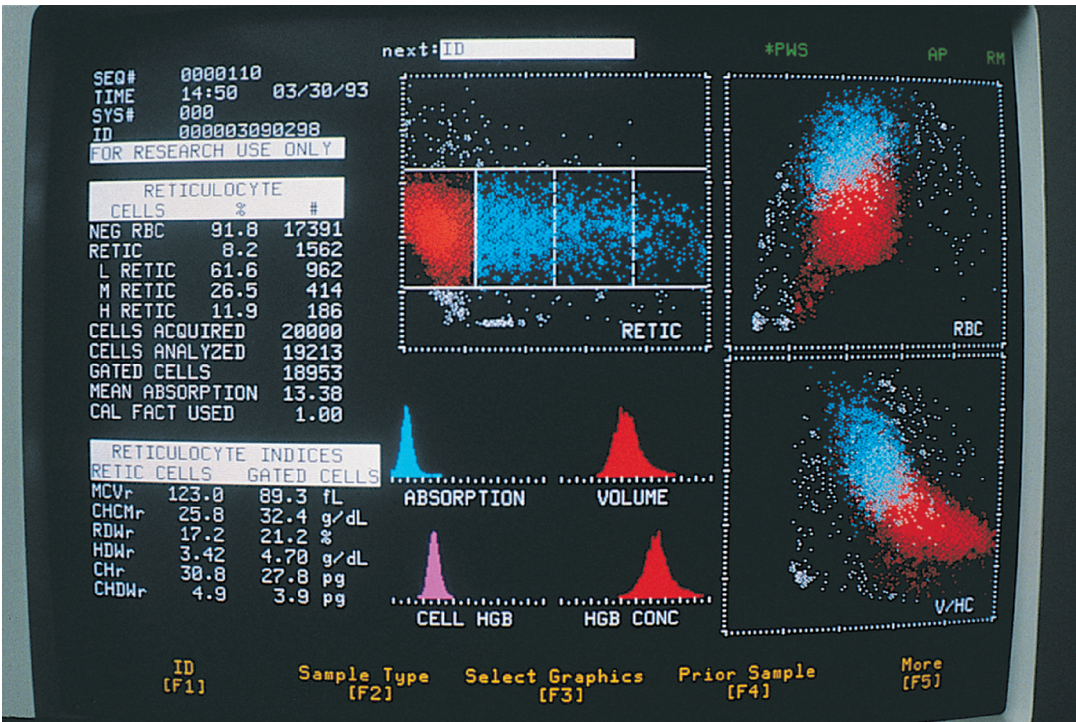


FIGURA 2.23 Fotografia do monitor em cores do contador Bayer H.3. O *scattergram* mostra o volume e o conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos (em azul) em relação aos dos eritrócitos (em vermelho), em um mapa Mie e em um citograma. Essa amostra tem alta contagem de reticulócitos como resultado de uma reação transfusional hemolítica.

dos reticulócitos, pois a intensidade da fluorescência ou da absorção do corante do ácido nucleico é proporcional à quantidade de RNA da célula. Os instrumentos podem classificar os reticulócitos em baixa, intermediária e alta (ou só alta e baixa) fluorescência/absorvância/dispersão de luz, valores que indicam um grau crescente de imaturidade; podem, também, fornecer uma média de fluorescência. Embora variem muito conforme os instrumentos utilizados, essas medidas podem ter significado clínico, desde que consideradas em relação aos valores de referência do instrumento em uso. Por exemplo, a fração reticulocítica imatura é maior no Pentra 120 do que no Sysmex XE-2100 e no Sysmex R-2000 [153] (ver também Tabela 5.20). Os limites de referência também são específicos para o volume reticulocítico médio; essas medidas são de significação clínica quando interpretadas considerando-se os valores específicos do instrumento. Em anemias causadas por hemólise ou perda de sangue, a porcentagem de reticulócitos imaturos eleva-se com o crescimento da contagem total de reticulócitos [154]. Quando há disritropoese, entretanto, a porcentagem

de reticulócitos imaturos pode estar elevada, apesar de uma contagem total normal ou reduzida. Isso observa-se, por exemplo, na leucemia mieloide aguda, nas síndromes mielodisplásicas, na anemia megaloblástica e na anemia aplástica [154-156]. Um aumento desproporcional de reticulócitos imaturos indica uma maturação anormal dos reticulócitos [155]. Em outras anemias com pouca disritropoese, mas com má resposta reticulocitária – por exemplo, na anemia ferropênica ou na anemia da insuficiência renal crônica –, a contagem absoluta de reticulócitos está reduzida, mas a porcentagem de reticulócitos imaturos é normal. A porcentagem de reticulócitos imaturos aumenta, sem anemia e sem aumento da porcentagem de reticulócitos, em significativa proporção de pacientes com doença cardíaca ou pulmonar [157]; acredita-se ser decorrente da liberação de eritropoetina como resposta à hipoxia.

Quando ressurgue uma eritropoese efetiva após um período de produção reduzida – por exemplo, após transplante de medula óssea ou na recuperação de quimioterapia –, há aumento da porcentagem e do número absoluto de reticulócitos imaturos

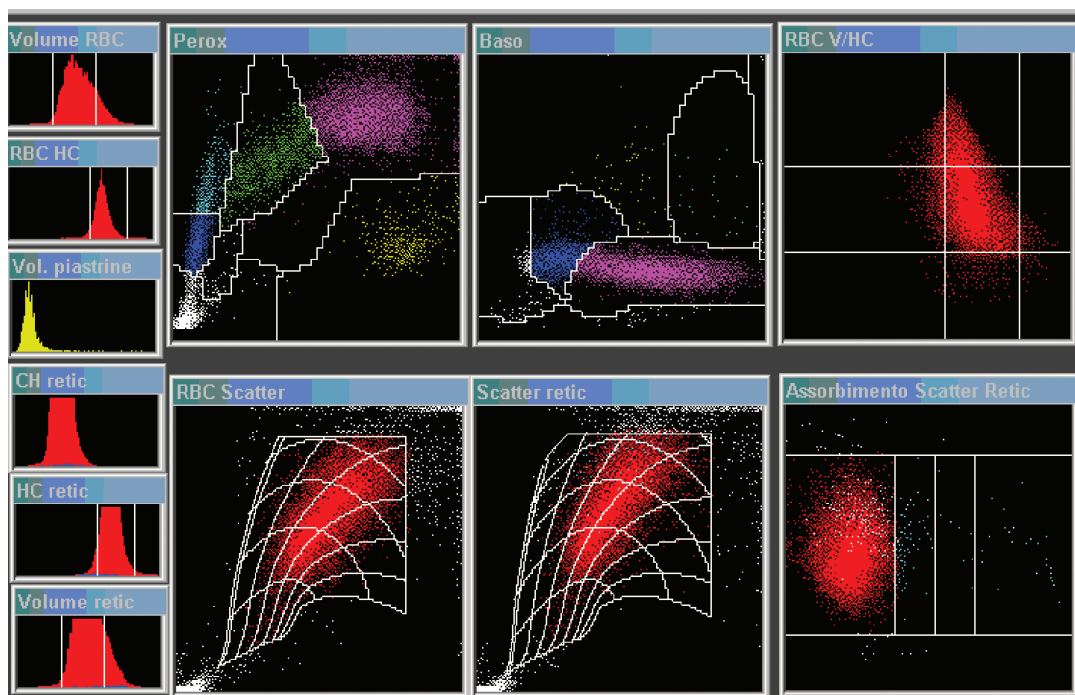


FIGURA 2.24 Scatter plots e histogramas produzidos pelo Siemens Advia 120 em amostra de sangue de paciente com aplasia eritroide pura mostrando reticulocitopenia. O citograma RBC V/HC (volume corpuscular contra concentração hemoglobínica) mostra macrocitose (pontilhado aumentado acima do limiar de volume superior). Note-se, em comparação com a reticulocitose vista na Figura 2.23, que praticamente não há reticulócitos (pontos azuis) no plot de absorção de luz no canal de reticulócitos (na base, à direita). A contagem de reticulócitos era muito baixa, 0,43% = 9.200/ μ L. Os índices hematimétricos eram: E 2,14 M/ μ L, Hb 6,8 g/dL, Hct 21%, VCM 99 fL, HCM 31,8 pg, CHCM 32,1 g/dL. Note-se também que, dada a heterogeneidade de tamanho dos eritrócitos (RDW 21%), o VCM no limite superior de referência não faz notar a presença do número significativo de macrócitos vistos no histograma e no citograma; os flags do instrumento foram macrocitose +++ e anisocitose ++. Cortesia da Professora Gina Zini.

antes do aumento do número total de reticulócitos, de neutrófilos e de plaquetas [158]. De modo similar, o aumento na porcentagem de reticulócitos imaturos prediz a recuperação hematopoética quando se faz tratamento imunossupressivo de anemia aplásica grae e precede o aumento do número de neutrófilos e do número total de reticulócitos [159]. A contagem de reticulócitos imaturos em alguns trabalhos, mas não em todos, tem-se mostrado útil para prever o momento de coleta de células primitivas no sangue periférico para transplante [52].

Plaquetas reticuladas

Plaquetas jovens, recém-saídas da medula, contêm quantidades significativas de RNA; elas podem ser identificadas à microscopia após coloração do sangue com azul-de-metileno. Por analogia aos reticulócitos, foram denominadas “plaquetas reticuladas”; contadores automatizados de reticulócitos podem ser modificados para contá-las. O Sysmex

R-3000 foi modificado para contar plaquetas reticuladas e plaquetas grandes. Plaquetas reticuladas podem ser contadas em um citômetro de fluxo de uso geral, após marcação com um corante fluorescente, como o tiazol-laranja, capaz de ligar-se a ácidos nucleicos; a concentração do fluorocromo deve ser meticulosamente calculada para evitar a ligação a outros componentes plaquetários, distintos do RNA [160]. É possível usar fluorescência de duas cores, combinando um corante de ácidos nucleicos com um anticorpo monoclonal fluorescente plaquetário como o CD61 [161]. Plaquetas reticuladas atualmente podem ser contadas em analisadores automáticos.

Na maioria dos trabalhos, um número aumentado de plaquetas reticuladas correlacionou-se com trombocitopenias por destruição periférica das plaquetas, diferenciando-as das trombocitopenias por falta de produção na medula óssea, mas há sobreposição de resultados, e, também, já foram

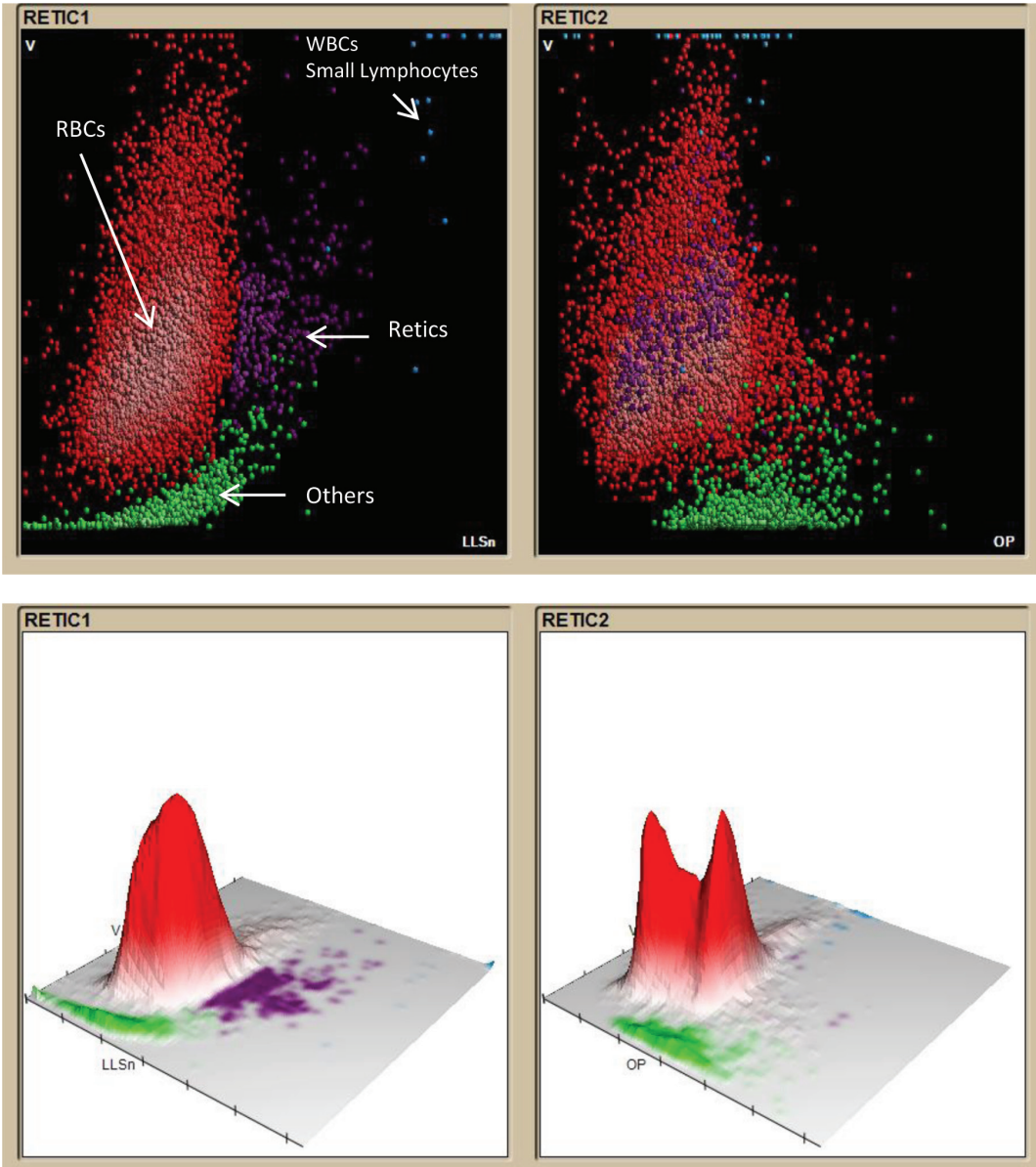


FIGURA 2.25 Scatter plots e representações tridimensionais de reticulócitos do instrumento Beckman-Coulter DxH 800 de amostra de sangue normal. No gráfico de volume (v) contra logaritmo de dispersão de luz (LLSn), os reticulócitos e os reticulócitos imaturos formam *clusters* distintos dos eritrócitos e dos leucócitos (RETIC1, esquerda, superior e inferior). No gráfico de volume contra opacidade (OP), os reticulócitos parecem não se separar (RETIC2, à direita, superior e inferior), mas, na verdade o *software* identifica-os na análise tridimensional. Cortesia de Beckman-Coulter.

publicados trabalhos com dados conflitantes [160, 162, 163]. Após transplante de medula óssea [164], durante a recuperação de quimioterapia e durante o tratamento de púrpura trombocitopênica trombótica [161] e púrpura trombocitopênica autoimune,

um aumento de plaquetas reticuladas precede e indica um aumento da contagem de plaquetas. Contagens de plaquetas reticuladas requerem valores de referência específicos para cada instrumento.

TABELA 2.7 Tecnologia empregada para a contagem automatizada de reticulócitos nos instrumentos atuais [42, 150]

Instrumento	Fluorocromo ou corante
Métodos baseados em fluorescência	
R-1000, R-2000, R-3000, R-3500, SE-9000 e SE-9500 (Sysmex)	Auramina O
XE-5000 e XN (Sysmex)	Corante de polimetina próprio
Cell-Dyn 4000 e Cell-Dyn Sapphire (Abbott)	CD4K530 (medidas de dispersão de luz e fluorescência)
XL (Beckman-Coulter)	Corifosfina O
FACScan (Becton Dickinson)	Tiazol-laranja
Pentra 120 Retic e Pentra DX Nexus (Horiba ABX Diagnostics) [150]	Tiazol-laranja
Agentes não fluorescentes que se ligam ao RNA	
H.3 (Bayer) e Advia 120 (Siemens)	Oxazina 750 (medida de absorvância)
Cell-Dyn 3500 e Cell-Dyn Ruby (Abbott)	Novo-azul-de-metileno (medida de dispersão de luz)
STKS/MAXM/GenS/DxH 800 (Beckman-Coulter)	Novo-azul-de-metileno (VCS – volume, condutividade, e medida de dispersão em estromas ou eritrócitos esferados)

Exames junto ao paciente

Instrumentos de gasometria sanguínea dosam Hb diretamente por espectrofotometria ou calculam-na pelo Hct determinado por condutividade; alguns simultaneamente fazem várias dosagens bioquímicas. Além dos instrumentos de gasometria, há vários aparelhos pequenos e de operação simples a ponto de permitir o uso junto ao paciente, por pessoal sem o treinamento completo de cientistas biomédicos, mas treinados apenas para esse trabalho mais limitado. Alguns instrumentos medem vários parâmetros, enquanto outros dosam apenas Hb. O HemoCue® (HemoCue AG, Wetzi-kon, Suíça) dosa Hb por uma reação de metemoglobino-azida e fotometria. O HemoCue® WBC DIFF, além disso, faz uma contagem de leucócitos e uma fórmula diferencial de cinco partes. O cartucho de hematócrito iSTAT (Abbott Point of Care) determina o Hct por condutividade e calcula a Hb a partir do Hct; leucocitose extrema pode gerar um resultado falsamente elevado [165]. Uma estimativa da Hb pode ser feita apenas pela comparação da cor de uma gota de sangue em papel de filtro, com uma escala de cores [166]. O método é apropriado para triagem em clínicas periféricas com dificuldade de acesso a laboratório. Pode ser obtido em Teaching-Aids at Low Cost (www.talkuc.org). É usado principalmente em países em desenvolvimento, mas também se presta para triagem de doadores em bancos de sangue. A cor de uma gota de sangue também pode ser comparada com discos coloridos, como no Lovibond Tintometer (www.tintometer.com).

Métodos não invasivos

Um novo instrumento, portátil, o Hemoscan, tem uma sonda que se coloca manualmente sob a língua [167]; o dispositivo emite luz, a qual se reflete dos tecidos para uma minicâmera. O instrumento fornece uma estimativa de Hb, Hct e contagem de leucócitos. Um princípio similar é usado no Hemo-Monitor e no Astrim, que dosam a Hb de modo não invasivo, baseando-se na absorvância luminosa na faixa infravermelha quando os dedos são inseridos no instrumento [168, 169]; os resultados são comparáveis aos das dosagens convencionais na maioria dos pacientes, mas não nos que têm paraproteinemia [169]. A correlação com os métodos padronizados e a exatidão, entretanto, não parecem ser suficientes para considerar esses instrumentos um avanço significativo [170]. O Pronto-7 (Masimo Corporation) também faz uma estimativa da Hb com base em absorção luminosa de um dedo, com resultados similares aos das dosagens laboratoriais [171]; também são medidos a SpO₂, a frequência do pulso e o índice de perfusão. A Hb também pode ser dosada por método não invasivo pela introdução de um dedo com um sensor em formato de anel ligado a um monitor nos instrumentos NBM 200 e NBM 200MP (OrSense). O primeiro dosa a Hb por absorção de luz e conta a pulsação; o segundo, além disso, mede a saturação de oxigênio.

HemoGlobe é uma adaptação nova de um telefone celular, designada para uso em países subdesenvolvidos, que estima a Hb por oximetria de pulso e transforma os resultados em gráficos coloridos: verde para anemia leve, amarelo para moderada e vermelho para anemia severa.

<http://releases.jhu.edu/2012/07/24/undergraduates-cellphone-screening-device-for-anemia-wins-250000-prize/>.

Conservação das amostras de sangue antes dos exames

Se for previsto atraso no processamento de hemograma, as amostras de sangue devem ser conservadas a 4°C. Conservação à temperatura ambiente aumenta o número de *flags* e provoca inexatidões. Nos instrumentos Siemens H.1 e da série Advia, por exemplo, torna-se frequente o *flag* de desvio à esquerda, o VCM aumenta e a CHCM diminui. No Cell-Dyn 3500, aumenta o número de *flags*, diminui a contagem de leucócitos no sistema óptico (mas não no de impedância), diminui a porcentagem de neutrófilos e aumenta a de linfócitos, aumenta o VCM e diminui a CHCM [172]. As características das plaquetas variam com a conservação; com o Advia 120, há aumento do VPM e diminuição do MPC [133]. É importante que os técnicos de laboratório estejam familiarizados com os efeitos do armazenamento nos resultados dos instrumentos específicos que utilizam.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências

- 1 International Committee for Standardization in Haematology (1978) Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemiglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). *J Clin Pathol*, **31**, 139–143.
- 2 Davis B and Jungerius B, on behalf of International Council for the Standardization of Haematology (ICSH) (2009) International Council for Standardization in Haematology technical report 1-2009: new reference material for haemiglobincyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements. *Int J Lab Hematol*, **32**, 139–141.
- 3 van Kampen EJ and Zijlstra WG (1983) Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Adv Clin Chem*, **23**, 199–257.
- 4 Lewis SM, Garvey B, Manning R, Sharp SA and Wardle J (1991) Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry. *Clin Lab Haematol*, **13**, 279–290.
- 5 Morris LD, Pont A and Lewis SM (2001) Use of a new HemoCue system for measuring haemoglobin at low concentrations. *Clin Lab Haematol*, **23**, 91–96.
- 6 International Committee for Standardization in Haematology Expert Panel on Blood Cell Sizing (1980) Recommendation for reference method for determination by centrifugation of packed cell volume of blood. *J Clin Pathol*, **33**, 1–2.
- 7 ICSH (1982) Selected methods for the determination of the packed cell volume. In: van Assendelft OW & England JM (eds) *Advances in Hematological Methods: the blood count*. CRC Press, Boca Raton.
- 8 Guthrie DL and Pearson TC (1982) PCV measurement in the management of polycythaemic patients. *Clin Lab Haematol*, **4**, 257–265.
- 9 Weatherall MS and Sherry KM (1997) An evaluation of the Spuncrit™ infra-red analyser for measurement of haematocrit. *Clin Lab Haematol*, **19**, 183–186.
- 10 Aoun H (1989) When a house officer gets AIDS. *N Engl J Med*, **321**, 693–696.
- 11 Anonymous (1999) Glass capillary tubes: joint safety advisory about potential risks. *Lab Med*, **30**, 299.
- 12 Crosland-Taylor PJ (1982) The micro PCV. In: van Assendelft OW & England JM (eds) *Advances in Hematological Methods: the blood count*. CRC Press, Boca Raton.
- 13 Lampasso JA (1965) Error in hematocrit value produced by excessive ethylenediaminetetraacetate. *Am J Clin Pathol*, **44**, 109–110.
- 14 Pennock CA and Jones KW (1966) Effects of ethylenediaminetetra-acetic acid (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell volume. *J Clin Pathol*, **19**, 196–199.
- 15 Karlow MA, Westengard JC and Bull BS (1989) Does tube diameter influence the packed cell volume? *Clin Lab Haematol*, **11**, 375–383.
- 16 Bryner MA, Houwen B, Westengard J and Klein O (1997) The spun micro-haematocrit and mean cell volume are affected by changes in the oxygenation state of red blood cells. *Clin Lab Haematol*, **19**, 99–103.
- 17 Lines RW and Grace E (1984) Choice of anticoagulants for packed cell volume and mean cell volume determination. *Clin Lab Haematol*, **6**, 305–306.
- 18 Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology (2000) ICSH recommendation for the measurement of a reference packed cell volume. *Lab Haematol*, **7**, 148–170.
- 19 International Committee for Standardization in Haematology (1980) Recommended methods for measurement of red cell and plasma volume. *J Nucl Med*, **21**, 793–800.
- 20 Bull BS, Fujimoto K, Houwen B, Klee G, van Hove L and van Assendelft OW on behalf of the ICSH Expert Panel on Cytometry (2003) International Council for Standardization in Haematology (ICSH)

- Recommendations for "Surrogate Reference" Method for the Packed Cell Volume. *Lab Hematol*, **9**, 1–9.
- 21 Briggs C and Bain BJ (2012) Basic haematological techniques. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA and Lewis SM (eds) *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
 - 22 International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry (1994) Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. *Clin Lab Haematol*, **16**, 131–138.
 - 23 Barnett D, Goodfellow K, Ginnever J, Granger V, Whitby L and Reilly JT (2001) Low level leucocyte counting: a critical variable in the validation of leucodepleted blood transfusion components as highlighted by an external quality assessment study. *Clin Lab Haematol*, **23**, 43–51.
 - 24 Lewis SM (1982) Visual haemocytometry. In: van Assendelft OW & England JM (eds) *Advances in Hematological Methods: the blood count*. CRC Press, Boca Raton.
 - 25 Dickerhoff R and van Ruecker A (1995) Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin Lab Haematol*, **17**, 163–172.
 - 26 Tanaka C, Ishii T and Fujimoto K (1996) Flow cytometric platelet enumeration utilizing monoclonal antibody CD42a. *Clin Lab Haematol*, **18**, 265–269.
 - 27 Harrison P, Horton A, Grant D, Briggs C and Machin S (2000) Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol*, **108**, 228–235.
 - 28 International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Haematology Task Force on Platelet Counting (2001) Platelet counting by the RBC/platelet method: a reference method. *Am J Clin Pathol*, **115**, 460–464.
 - 29 Norris S, Pantelidou D, Smith D and Murphy MF (2003) Immunoplatelet counting: potential for reducing the use of platelet transfusions through more accurate platelet counting. *Br J Haematol*, **121**, 605–613.
 - 30 International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry (1995) Recommendation of the International Council for Standardization in Haematology on reporting differential leucocyte counts. *Clin Lab Haematol*, **17**, 113.
 - 31 Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) *Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document H20-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
 - 32 Talstad I (1981) Problems in microscopic and automatic cell differentiation of blood and cell suspensions. *Scand J Haematol*, **26**, 398–406.
 - 33 Davidson E (1958) The distribution of cells in peripheral blood smears. *J Clin Pathol*, **11**, 410–411.
 - 34 Rümke CL (1960) Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle*, **4**, 154–157.
 - 35 England JM and Bain BJ (1976) Total and differential leucocyte count. *Br J Haematol*, **33**, 1–7.
 - 36 Koepke IF and Koepke JA (1986) *Reticulocytes*. *Clin Lab Haematol*, **8**, 169–179.
 - 37 The Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology (1992) *ICSH Guidelines for Reticulocyte Counting by Microscopy of Supravivally Stained Preparations*. World Health Organization, Geneva.
 - 38 Perrotta AL and Finch CA (1972) The polychromatophilic erythrocyte. *Am J Clin Pathol*, **57**, 471–477.
 - 39 Crouch JY and Kaplow LS (1985) Relationship of reticulocyte age to polychromasia, shift cells, and shift reticulocytes. *Arch Pathol Lab Med*, **109**, 325–329.
 - 40 Lowenstein ML (1959) The mammalian reticulocyte. *Int Rev Cytol*, **9**, 135–174.
 - 41 Brecher G and Schneiderman MR (1950) A time-saving device for counting of reticulocytes. *Am J Clin Pathol*, **20**, 1079–1083.
 - 42 Koepke JA (1999) Update on reticulocyte counting. *Lab Med*, **30**, 339–343.
 - 43 Hillman RS and Finch CA (1969) The misused reticulocyte. *Br J Haematol*, **17**, 313–315.
 - 44 Fannon M, Thomas R and Sawyer L (1982) Effect of staining and storage times on reticulocyte counts. *Lab Med*, **13**, 431–433.
 - 45 NCCLS (2004) *Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved guideline—Second Edition*. NCCLS document H44-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
 - 46 Kratz A, Bengtsson HI, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY *et al.* (2005) Performance evaluation of the CellaVision DM96 system: WBC differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Am J Clin Pathol*, **124**, 770–781.
 - 47 Ceelie H, Dinkelaar RB and van Gelder W (2007) Examination of peripheral blood films using automated microscopy: evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol*, **60**, 72–79.
 - 48 Briggs C and Machin S (2012) Can automated blood film analysis replace the manual differential? *Int J Lab Hematol*, **34**, Suppl. 1, 6–7.
 - 49 Smits SM and Leyte A (2014) Clinical performance evaluation of the CellaVision Image Capture System in the white blood cell differential on peripheral blood smears. *J Clin Pathol*, **67**, 168–172.
 - 50 Kunicka J, Malin M, Zelmanovic D, Katzenberg M, Canfield W, Shapiro P and Mohandas N (2001) Automated quantification of hemoglobin-based blood substitutes in whole blood samples. *Am J Clin Pathol*, **116**, 913–919.
 - 51 Rowan RM (1983) *Blood Cell Volume Analysis*. Albert Clark, London.
 - 52 Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV, Siourounis PV, Stamulakatu AK, Premitis EE *et al.* (1993) The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume. A proposed method for the comparative assessment of this effect among various haematology analysers. *Clin Lab Haematol*, **16**, 235–245.

- 53 Igout J, Fretigny M, Vasse M, Callat MP, Silva M, Willemont L *et al.* (2004) Evaluation of the Coulter LH750 haematology analyser compared with flow cytometry as the reference method for WBC, platelet and nucleated RBC count. *Clin Lab Haematol*, **26**, 1–7.
- 54 Zini G, d'Onofrio G, Garzia M and di Mario A (2005) *Citologia Ematologica in Automazione*. Verduci Editore, Rome.
- 55 Banfi G, Di Gaetano N, Lopez RS and Melegati G (2007) Decreased mean spheroid cell volume values in top-level rugby players are related to the intravascular hemolysis induced by exercise. *Lab Hematol*, **13**, 103–107.
- 56 Urrechaga E (2010) The new mature red cell parameter, low haemoglobin density of the Beckman-Coulter LH750: clinical utility in the diagnosis of iron deficiency. *Int J Lab Hematol*, **32**, e144–150.
- 57 Dopsaj V, Martinovic J and Dopsaj M (2014) Early detection of iron deficiency in elite athletes: could microcytic anemia factor (Maf) be useful? *Int J Lab Hematol*, **36**, 37–44.
- 58 Shelat SG, Canfield W and Shibutani S (2010) Differences in detecting blasts between ADVIA 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. *Int J Lab Hematol*, **32**, 113–116.
- 59 Fourcade C, Casbas MJ, Belaoui H, Gonzalez JJ, Garcia PJ and Pepio MA (2004) Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S. *Clin Lab Haematol*, **26**, 367–372.
- 60 Sharma P, Bhargava M, Sukhachev D, Datta S and Watal C (2014) LH750 hematology analyzers to identify malaria and dengue and distinguish them from other febrile illnesses. *Int J Lab Hematol*, **36**, 45–55.
- 61 Kim SY, Kim JE, Kim HK, Han KS and Toh CH (2010) Accuracy of platelet counting by automated hematology analyzers in acute leukemia and disseminated intravascular coagulation: potential effects of platelet activation. *Am J Clin Pathol*, **134**, 634–647.
- 62 Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P and Lecompte T (2012) Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. *Int J Lab Hematol*, **34**, 300–310.
- 63 Chaves F, Tierno B and Xu D (2005) Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer. *Am J Clin Pathol*, **124**, 440–444.
- 64 Bagdasaryan R, Zhou Z, Tierno B, Rosenman D and Xu D (2007) Neutrophil VCS parameters are superior indicators for acute infection. *Lab Hematol*, **13**, 12–16.
- 65 Mardi D, Fwity B, Lobmann R and Ambrosch A (2010) Mean cell volume of neutrophils and monocytes compared with C-reactive protein, interleukin-6 and white blood cell count for prediction of sepsis and nonsystemic bacterial infections. *Int J Lab Hematol*, **32**, 410–418.
- 66 Charafeddine KM, Youssef AM, Mahfouz RA, Sarriddine DS and Daher RT (2011) Comparison of neutrophil volume distribution width to C-reactive protein and procalcitonin as a proposed new marker of acute infection. *Scand J Infect Dis*, **43**, 777–784.
- 67 Zhu Y, Cao X, Chen Y, Zhang K, Wang Y, Yuan K and Xu D (2012) Neutrophil cell population data: useful indicators for postsurgical bacterial infection. *Int J Lab Hematol*, **34**, 295–299.
- 68 Koenig S and Quillen K (2010) Using neutrophil and lymphocyte VCS indices in ambulatory pediatric patients presenting with fever. *Int J Lab Hematol*, **32**, 459–451.
- 69 Celik IH, Demirel G, Sukhachev D, Erdevi O and Dilman U (2013) Neutrophil volume, conductivity and scatter parameters with effective modeling of molecular activity statistical program gives better results in neonatal sepsis. *Int J Lab Hematol*, **35**, 82–87.
- 70 Bhargava M, Saluja S, Sindhuri U, Saraf A and Sharma P (2014) Elevated mean neutrophil volume+CRP is a highly sensitive and specific predictor of neonatal sepsis. *Int J Lab Hematol*, **36**, e11–e14.
- 71 Wiesent T, von Weikersthal L, Pujol N (2005) Automated detection of neutrophil dysplasia for the screening of myelodysplasia and myelodysplastic syndromes. *Blood*, **106**, 303b.
- 72 Miguel A, Orero M, Simon R, Collado R, Perez PL, Pacios A *et al.* (2007) Automated neutrophil morphology and its utility in the assessment of neutrophil dysplasia. *Lab Hematol*, **13**, 98–102.
- 73 Urrechaga E, Borque L and Escanero JF (2011) Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol*, **33**, 37–44.
- 74 Urrechaga E, Unceta M, Borque L and Escanero JF (2012) Low hemoglobin density potential marker of iron availability. *Int J Lab Hematol*, **34**, 47–51.
- 75 Senzel L, Kube B, Lou M, Gibbs A, Ahmed T and Brent Hall (2013) Contamination of patient blood samples by avian RBCs from control material during automated hematology analysis. *Am J Clin Pathol*, **140**, 127–131.
- 76 Hedley BD, Keeney M, Chin-Yee I and Brown W (2010) Initial performance evaluation of the Uni-Cel® DxH 800 Coulter® cellular analysis system. *Int J Lab Hematol*, **33**, 45–56.
- 77 Jean A, Boutet C, Lenormand B, Callat M-P, Buchonnet G, Barbay V *et al.* (2011) The new haematology analyzer DxH 800: an evaluation of the analytical performances and leucocyte flags, comparison with the LH 755. *Int J Lab Hematol*, **33**, 138–145.
- 78 Barnes PW, Eby CS and Shimer G (2010) Blast flagging with the UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System. *Lab Hematol*, **16**, 23–25.
- 79 Tan BT, Nava AJ and George TI (2011) Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780, and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on adult specimens in a tertiary care hospital. *Am J Clin Pathol*, **135**, 939–951.

- 80 Tan BT, Nava AJ and George TI (2011) Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800 and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on pediatric and neonatal specimens in a tertiary care hospital. *Am J Clin Pathol*, **135**, 929–938.
- 81 Kwon M-J, Nam M-H, Kim SH, Lim CS, Lee CK, Cho Y *et al.* (2011) Evaluation of the nucleated red blood cell count in neonates using the Beckman Coulter UniCel DxH 800 analyzer. *Int J Lab Hematol*, **33**, 620–628.
- 82 Park D-H, Park K, Park J, Park H-H, Chae H, Lim J *et al.* (2011) Screening of sepsis using leukocyte cell population data from the Coulter automatic blood cell analyzer DxH800. *Int J Lab Hematol*, **33**, 391–399.
- 83 Kahng J, Yahng SA, Lee JW, Kim Y, Kim M, Oh E-J *et al.* (2014) Novel markers of early neutrophilic and monocytic engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Lab Med*, **34**, 92–97.
- 84 Lee HK, Kim SI, Chae H, Kim M, Lim J, Oh EJ *et al.* (2012) Sensitive detection and accurate monitoring of *Plasmodium vivax* parasites on routine complete blood count using automatic blood cell analyzer (DxH800TM). *Int J Lab Hematol*, **34**, 201–207.
- 85 Kim J-E, Kim B-R, Woo K-S and Han J-Y (2012) Evaluation of the leukocyte differential on a new automated flow cytometry hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, **34**, 547–550.
- 86 Park BG, Park C-J, Kim S, Yoon C-H, Kim D-H, Jang S and Chi H-S (2012) Comparison of the Cytodiff flow cytometric leucocyte differential count system with the Sysmex XE-2100 and Beckman Coulter UniCel DxH 800. *Int J Lab Hematol*, **34**, 584–593.
- 87 Jo Y, Kim SH, Koh K, Park J, Shim YB, Lim J *et al.* (2011) Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using hematoflow method. *Korean J Lab Med*, **31**, 131–137.
- 88 Gowans ID, Hepburn MD, Clark DM, Patterson G, Rawlinson PSM and Bowen DT (1999) The role of the Sysmex SE9000 immature myeloid index and Sysmex R2000 reticulocyte parameters in optimizing the timing of peripheral blood stem cell harvesting in patients with lymphoma and myeloma. *Clin Lab Haematol*, **21**, 331–336.
- 89 Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R and Schwarzwinger I (2001) The new hematology analyzer Sysmex XE-2100; performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med*, **125**, 391–396.
- 90 Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, and Machin SJ (2000) New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE 2100. *Clin Lab Haematol*, **22**, 345–350.
- 91 Briggs C, Kunka A and Machin SJ (2004) The most accurate platelet count on the Sysmex XE-2100. Optical or impedance? *Clin Lab Haematol*, **26**, 157–158.
- 92 Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S and Machin SJ (2005) Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **126**, 93–99.
- 93 Pai S (2012) Pseudobasophilia on the Sysmex-XE 2100: a useful screening tool for primary dengue infection in endemic areas. *Int J Lab Hematol*, **34**, Suppl. 1, 25.
- 94 Grotto HZW and Noronha JFA (2004) Platelet larger cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia. *Clin Lab Haematol*, **26**, 347–349.
- 95 Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E *et al.* (2005) Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **128**, 698–702.
- 96 Ansari-Lari MA, Kickler TS and Borowitz MJ (2003) Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. *Am J Clin Pathol*, **120**, 795–799.
- 97 Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M *et al.* (2010) The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol*, **32**, 360–366.
- 98 Agorasti A, Nikolakopoulou E, Mitroglou V and Konstantinidou D (2012) The structural parameter NEUT-X in vitamin B12 deficiency. *Int J Lab Hematol*, **34**, Suppl. 1, 74.
- 99 Jain M, Gupta S, Jain J and Grover RK (2012) Usefulness of automated cell counter in detection of malaria in a cancer set up – our experience. *Indian J Pathol Microbiol*, **55**, 467–473.
- 100 Dubreuil P, Pihet M, Cau S, Croquefer S, Deguigne PA, Godon A *et al.* (2014) Use of Sysmex XE-2100 and XE-5000 hematology analyzers for the diagnosis of malaria in a nonendemic country (France). *Int J Lab Hematol*, **36**, 124–134.
- 101 Gulati GL, Bourne S, El Jamal SM, Florea AD and Gong J (2011) Automated lymphocyte counts vs manual lymphocyte counts in chronic lymphocytic leukemia patients. *Lab Med*, **42**, 545–548.
- 102 Amundsen EK, Urdal P, Hagve TA, Holthe MR and Henriksson CE (2012) Absolute neutrophil counts from automated hematology instruments are accurate and precise even at very low levels. *Am J Clin Pathol*, **137**, 862–869.
- 103 Amundsen EK, Henriksson CE, Holthe MR and Urdal P (2012) Is the blood basophil count sufficiently precise, accurate, and specific?: three automated hematology instruments and flow cytometry compared. *Am J Clin Pathol*, **137**, 86–92.
- 104 Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M and Hoshi Y (2005) Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol*, **27**, 242–246.
- 105 Pollard Y, Watts MJ, Grant D, Chavda N, Linch DC and Machin SJ (1999) Use of the haemopoietic progenitor cell count of the Sysmex SE-9500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells. *Br J Haematol*, **106**, 538–544.

- 106 Buttarello M and Plebani M (2008) Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*, **130**, 104–116.
- 107 Banno S, Ito Y, Tanaka C, Hori T, Fujimoto K, Suzuki T *et al.* (2005) Quantification of red blood cell fragmentation by the automated hematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation. *Clin Lab Haematol*, **27**, 292–296.
- 108 Lesesve J-F, Asnafi V, Braun F and Zini G (2012) Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exclude schistocytes on the blood film. *Int J Lab Hematol*, **34**, 566–576.
- 109 Schoorl M, Snijders D, Schoorl M, Boersma WG and Bartels PC (2012) Temporary impairment of reticulocyte haemoglobin content in subjects with community-acquired pneumonia. *Int J Lab Hematol*, **34**, 390–395.
- 110 Franck S, Linssen J, Messinger M and Thomas L (2004) Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem*, **50**, 1240–1242.
- 111 Miwa N, Akiba T, Kimata N, Hamaguchi Y, Arakawa Y, Tamura T *et al.* (2010) Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. *Int J Lab Hematol*, **32**, 248–255.
- 112 Sudmann ÅA, Piehler A and Urdal P (2012) Reticulocyte hemoglobin equivalent to detect thalassemia and thalassemic hemoglobin variants. *Int J Lab Hematol*, **24**, 605–613.
- 113 Yamaoka G, Kubota Y, Nomura T, Inage T, Arai T, Kitanaka A *et al.* (2010) The immature platelet fraction is a useful marker for predicting the timing of platelet recovery in patients with cancer after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol*, **32**, e208–e216.
- 114 Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A, Kurokouchi K, Inage T, Saigo K *et al.* (2010) Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol*, **32**, 299–306.
- 115 Sugimori N, Kondo Y, Shibayama M, Omote M, Takami A, Sugimori C *et al.* (2009) Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. *Eur J Haematol*, **81**, 54–60.
- 116 Urrechaga E, Borque L and Escanero JF (2011) Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassaemia. *J Clin Lab Anal*, **25**, 223–228.
- 117 Urrechaga E, Borque L and Escanero JF (2011) The role of automated measurement of red cell subpopulations on the Sysmex XE 5000 analyzer in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Int J Lab Hematol*, **33**, 30–36.
- 118 Urrechaga E, Borque L and Escanero JF (2011) The role of automated measurement of RBC subpopulations in differential diagnosis of microcytic anemia and β -Thalassemia screening. *Am J Clin Pathol*, **135**, 374–379.
- 119 Buttarello M, Pajola R, Novello E, Rebeschini M, Cantaro S, Oliosi F *et al.* (2010) Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. *Am J Clin Pathol*, **133**, 949–954.
- 120 Chalvatzi K, Spiroglou S, Nikolaidou A and Diza E (2013) Evaluation of fragmented red cell (FRC) counting using Sysmex XE-5000 – Does hypochromia play a role? *Int J Lab Hematol*, **35**, 193–199.
- 121 Briggs CJ, Linssen J, Longair I and Machin SJ (2011) Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. *Am J Clin Pathol*, **136**, 309–316.
- 122 Eilertsen H, Vøllestad NK and Hagve T-A (2013) The usefulness of blast flags on the Sysmex XE-5000 is questionable. *Am J Clin Pathol*, **139**, 633–640.
- 123 Pozdnyakova O and Dorfman DM (2013) Sysmex XE-5000 Blast Q Flag Analysis. *Am J Clin Pathol*, **140**, 918–919.
- 124 Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D and Machin S (2012) Performance evaluation of the Sysmex XN modular system. *J Clin Pathol*, **65**, 1024–1030.
- 125 Hotton J, Broothaers J, Swaelens C and Cantinieaux B (2013) Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: Cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. *Am J Clin Pathol*, **140**, 845–852.
- 126 Leers MPG, Goertz H, Feller A and Hoffmann JJML (2011) Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Ruby and the Sysmex XT-2000i haematology analysers. *Int J Lab Hematol*, **33**, 19–29.
- 127 Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J and Groner W (1986) Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood*, **68**, 506–513.
- 128 von Feltan U, Furlan M, Frey R and Bucher U (1978) Test of a new method for hemoglobin determinations in automatic analysers. *Med Lab*, **31**, 223–231.
- 129 Breymann C, Rohling R, Krafft A, Huch A and Huch R (2000) ‘Blood doping’ with recombinant erythropoietin (rhEPO) and assessment of functional iron deficiency in healthy volunteers. *Br J Haematol*, **108**, 883–888.
- 130 Thomas C and Thomas L (2002) Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*, **8**, 1066–1076.
- 131 Tsakonas DP, Tsakona CP, Worman CP, Goldstone AH and Nicolaides KH (1994) Myeloperoxidase activity and nuclear segmentation of maternal neutrophils during normal pregnancy. *Clin Lab Haematol*, **16**, 337–342.
- 132 Chapman DH, Hardin J-A, Miers M, Moyle S and Kinney MC (2001) Reduction of the platelet review rate using two-dimensional platelet method. *Am J Clin Pathol*, **115**, 894–898.
- 133 Brummitt DR and Barker HF (2000) The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIATM120 full blood count analyser. *Clin Lab Haematol*, **22**, 103–107.
- 134 Meintker L, Ringwald J, Rauh M and Krause SW (2013) Comparison of automated differential blood

- cell counts from Abbott Sapphire, Siemens Advia 120, Beckman Coulter DxH 800, and Sysmex XE-2100 in normal and pathologic samples. *Am J Clin Pathol*, **139**, 641–650.
- 135 Greenfield HM, Sweeney DA, Newton RK, Leather A, Murray J, Angelica R *et al.* (2005) Estimation of haematopoietic progenitor cells in peripheral blood by the Advia 120 and BD vantage flow cytometer: a direct comparison for the prediction of adequate collections. *Clin Lab Haematol*, **27**, 287–291.
 - 136 Kratz A, Maloum K, O'Malley C, Zini G, Rocco V, Zelmanovic D and Kling G (2006) Enumeration of nucleated red blood cells with the ADVIA 2120 Hematology System: an International Multicenter Clinical Trial. *Lab Haematol*, **12**, 63–70.
 - 137 Cornbleet PJ, Myrick D, Judkins S and Levy R (1992) Evaluation of the CELL-DYN 3000 differential. *Am J Clin Pathol*, **98**, 603–614.
 - 138 Kim YR, Yee M, Metha S, Chupp V, Kendall R and Scott CS (1998) Simultaneous differentiation and quantification of erythroblasts and white blood cells on a high throughput clinical haematology analyser. *Clin Lab Haematol*, **20**, 21–29.
 - 139 Grimaldi E and Scopacasa F (2000) Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol*, **113**, 497–505.
 - 140 Hoedemakers RMJ, Pennings JMA and Hoffmann JJML (1999) Performance characteristics of blast flagging on the Cell-Dyn 4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol*, **21**, 347–351.
 - 141 Hoffmann JJML and Hoedemakers RMJ (2004) Diagnostic performance of the variant lymphocyte flag of the Abbott Cell-Dyn 4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol*, **26**, 9–13.
 - 142 Gill JE, Davis KA, Cowart WJ, Nepacena FU and Kim Y-T (2000) A rapid and accurate closed-tube immunoassay for platelets on an automated hematology analyzer. *Am J Clin Pathol*, **114**, 47–56.
 - 143 Kunz D, Kunz WS, Scott CS and Gressner AM (2001) Automated CD61 immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *Br J Haematol*, **112**, 584–592.
 - 144 Molera T, Roemer B, del Mar Perera Alvarez M, Lemes A, de la Iglesia Iñigo S, Palacios G and Scott CS (2005) Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haematol*, **27**, 224–234.
 - 145 Little BH, Robson R, Roemer B and Scott CS (2005) Immunocytometric quantitation of foeto-maternal haemorrhage with the Abbott Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol*, **27**, 21–31.
 - 146 Scott CS, Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV and Coetzer TL (2003) Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol*, **25**, 77–86.
 - 147 Hänscheid T, Romão R, Grobusch MP, Amaral T and Melo-Cristino J (2011) Limitation of malaria diagnosis with the Cell-Dyn® analyser: not all haemozoin-containing monocytes are detected or shown. *Int J Lab Hematol*, **33**, e14–e16.
 - 148 Ermens AA, Hoffmann JJ, Krokenberger M and Van Wijk EM (2012) New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol*, **34**, 274–282.
 - 149 Khoo T-L, Xiros N, Guan F, Orellana D, Holst J *et al.* (2013) Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Emerald for use as a bench-top analyzer in a research setting. *Int J Lab Hematol*, **35**, 447–456.
 - 150 Lacombe F, Lacoste L, Vial J-P, Briais A, Reiffers J, Boisseau MR and Bernard P (1999) Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurements. *Am J Clin Pathol*, **112**, 677–685.
 - 151 Doretto P, Biasioli B, Casolari B, Pasini L, Bulian P, Buttarello M *et al.* (2011) Conteggio reticulocitario automatizzato: valutazione NCCLS H-44 ed ICSH su 5 strumenti. In: Cenci A and Cappelletti P (eds) *Appunti di Ematologia di Laboratorio*. MAF Servizi Editore, Turin.
 - 152 Riley RS, Ben-Ezra JM and Tidwell A (2001) Reticulocyte enumeration: past & present. *Lab Med*, **10**, 599–608.
 - 153 Briggs C, Grant D and Machin SJ (2001) Comparison of the automated reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction measurements obtained with the ABX Pentra 120 Retic blood cell analyzer and the Sysmex XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Haematol*, **7**, 1–6.
 - 154 Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y and Houwen B (1994) Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol*, **47**, 736–739.
 - 155 Daliphard S, Bizet M, Callat MP, Beufe S, Latouche JB, Soufiani H and Monconduit M (1993) Evaluation of reticulocyte subtype distribution in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*, **44**, 210–220.
 - 156 Torres Gomez A, Casano J, Sanchez J, Madrigal E, Blanco F and Alvarez MA (2003) Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. *Clin Lab Haematol*, **25**, 283–288.
 - 157 Kendall RG, Mellors I, Hardy J and McArdle B (2001) Patients with pulmonary and cardiac disease show an elevated proportion of immature reticulocytes. *Clin Lab Haematol*, **23**, 27–31.
 - 158 Grotto HZW, Vigorito AC, Noronha JFA and Lima GALM (1999) Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clin Lab Haematol*, **23**, 285–287.
 - 159 Sica S, Sora F, Laurenti L, Piccirillo N, Salutari P, Chiusolo P *et al.* (1999) Highly fluorescent reticulocyte count predicts haemopoietic recovery after immunosuppression for severe aplastic anaemia. *Clin Lab Haematol*, **21**, 387–389.
 - 160 Robinson M, Machin S, Mackie I and Harrison P (2000) *In vivo* biotinylation studies: specificity of

- labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol*, **108**, 859–864.
- 161 Robinson M, Mackie I, Machin S and Harrison P (2000) Technological methods: two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol*, **22**, 211–213.
- 162 Romp KG, Peters WP and Hoffman M (1994) Reticulated platelet counts in patients undergoing autologous bone marrow transplantation: an aid in assessing marrow recovery. *Am J Hematol*, **46**, 319–324.
- 163 Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, Kosugi S, Kashiwagi H, Honda S and Tomiyama Y (2001) Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*, **115**, 656–664.
- 164 Koh K-R, Yamane T, Ohta K, Hino M, Takubo T and Tatsumi N (1999) Pathophysiological significance of simultaneous measurement of reticulated platelets, large platelets and serum thrombopoietin in non-neoplastic thrombocytopenic disorders. *Eur J Haematol*, **63**, 295–301.
- 165 Huisman A and de Vooght K (2012) Differences in point-of-care versus central laboratory hemoglobin level due to extreme leucocytosis. *Int J Lab Hematol*, **34**, Suppl. 1, 119.
- 166 Lewis SM, Scott GJ and Wynn KJ (1998) An inexpensive and reliable new haemoglobin colour scale for assessing anaemia. *J Clin Pathol*, **51**, 21–24.
- 167 Anonymous (2000) Hemoglobin, hematocrit, and WBCs in the microcirculation. *Lab Med*, **31**, 440–441.
- 168 Berrebi A and Fine I (1999) Non-invasive measurement of hemoglobin/hematocrit over a wide clinical range using a new optical signal processing method. *Blood*, **94**, Suppl. 1, Part 2, 10b.
- 169 Kinoshita Y, Yamane T, Takubo T, Kanashima H, Kamitani T, Tatsumi N and Hino M (2002) Measurement of hemoglobin concentrations using the AstrimTM noninvasive blood vessel monitoring apparatus. *Acta Haematol*, **108**, 109–110.
- 170 Saigo K, Imoto S, Hashimoto M, Mito H, Moriya J, Chinzei T *et al.* (2004) Noninvasive monitoring of hemoglobin: the effects of WBC counts on measurement. *Am J Clin Pathol*, **121**, 51–55.
- 171 Shah N, Osea EA and Martinez GJ (2014) Accuracy of noninvasive hemoglobin and invasive point-of-care hemoglobin testing compared with a laboratory analyzer. *Int J Lab Hematol*, **36**, 56–61.
- 172 Wood BL, Andrews J, Miller S and Sabath DE (1999) Refrigerated storage improves the stability of the complete blood count and automated differential. *Am J Clin Pathol*, **112**, 687–695.

CAPÍTULO 3

Morfologia das células sanguíneas

Exame de distensões sanguíneas

Distensões de sangue devem ser examinadas de forma sistemática, conforme é descrito a seguir:

- 1 Inicialmente, deve-se conferir a identificação do paciente e confirmar a correspondência da lâmina com o resultado do hemograma que a acompanha. A identificação deve incluir o sexo e a idade do paciente, uma vez que a interpretação exige essas informações. Em uma comunidade multiétnica, também é útil conhecer a origem étnica* do paciente.
- 2 Deve-se examinar macroscopicamente a lâmina, para confirmar se a distensão está adequada e verificar se há características anormais de distensão ou de coloração. A mais comum dessas alterações é o exagero da coloração azul provocado por hipergamaglobulinemia (Figura 3.1), decorrente de paraproteína, como no mieloma múltiplo e condições correlatas, ou de aumento reacional das imunoglobulinas, como na cirrose e na artrite reumatoide. As características tintoriais também são alteradas pela presença de substâncias estranhas, como a heparina, que confere um matiz róseo, ou pelo veículo de certas drogas endovenosas. Ocasionalmente, as alterações macroscópicas são causadas por precipitação de crioglobulina, aglutinação intensa dos eritrócitos, agregação plaquetária ou presença de conglomerados de células tumorais (Figuras 3.2 a 3.4).
- 3 O exame microscópico da distensão exige um microscópio corretamente instalado para perfeita iluminação. O exame deve ser feito inicialmente com pequeno aumento (com objetiva de 10 × ou 25 ×) e, em seguida, com maior aumento (com objetiva de 40 × ou 50 ×), sempre com oculares de 10 × ou 12 ×. O uso da objetiva

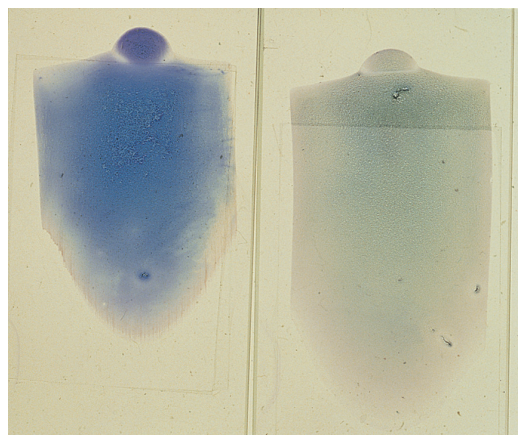


FIGURA 3.1 Distensão de sangue de paciente com mieloma múltiplo (à esquerda) comparado com sangue normal corado ao mesmo tempo (à direita). A coloração azul-escura deve-se à captação aumentada do componente básico do corante, decorrente da alta concentração de imunoglobulina.

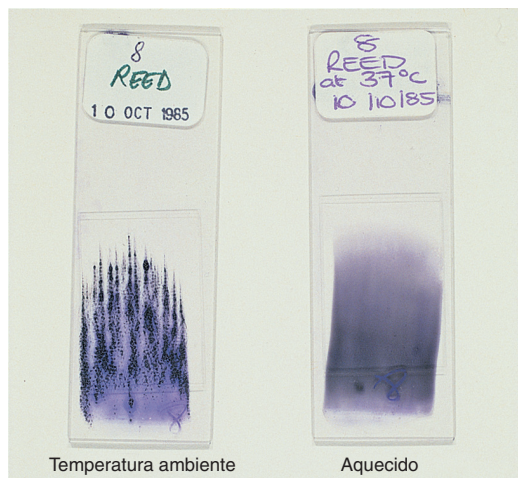


FIGURA 3.2 Distensão de sangue de paciente com uma potente crioaglutinina. A distensão à esquerda, com acentuada aglutinação, foi preparada com o sangue anticoagulado com EDTA, que permaneceu à temperatura ambiente. A distensão à direita, sem aglutinação macroscópica, foi preparada com o sangue aquecido a 37°C.

*N. de T. No Brasil, o dado é inviável pela miscigenação racial e por ser considerado politicamente incorreto.

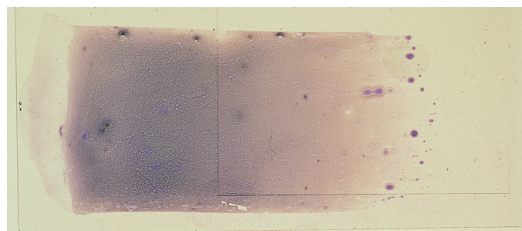


FIGURA 3.3 Distensão de sangue de paciente com mieloma múltiplo, mostrando precipitados de crioglobulina. Cortesia da Dra. Sue Fairhead, Londres.

de imersão 100 × impõe-se somente quando há necessidade de observar detalhes sutis ou de pesquisar parasitos da malária. Em laboratórios que usam distensões não montadas (sem lamínula), é vantajoso dispor de uma objetiva de imersão de aumento 50 ×, além da objetiva de 100 ×. Alguns óleos de imersão podem provocar dermatite de contato, assim, deve-se ter cuidado ao usá-los [1]. O uso de pequeno aumento é importante, pois permite a rápida varredura de grande parte da distensão, com detecção de células anormais quando estão em pequeno

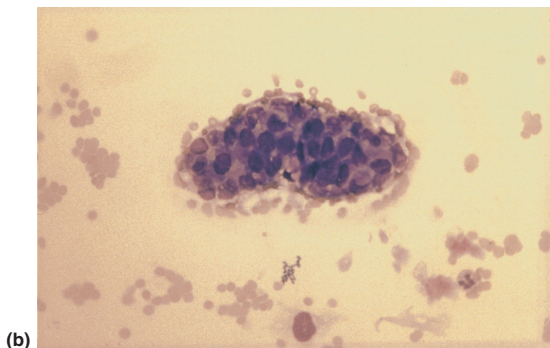
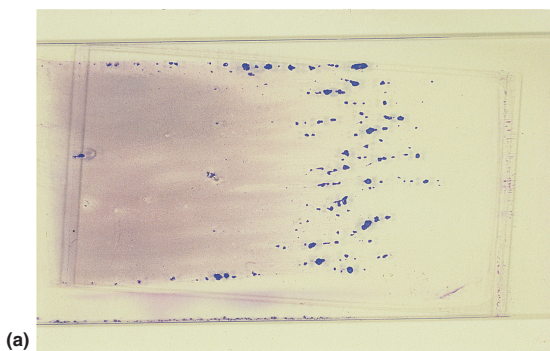


FIGURA 3.4 Distensão de sangue com agregados visíveis de células tumorais. (a) Fotografia macroscópica da lâmina. (b) Fotomicrografia mostrando que as massas visíveis são conglomerados de células tumorais. Cortesia da Dra. Sue Fairhead.

número. O uso de pequeno aumento também é útil na apreciação de *rouleaux* e de aglutinação de eritrócitos e leucócitos. O exame deve incluir a análise das margens e da cauda da distensão, pois células anormais grandes, além de aglomerados de células, distribuem-se preferencialmente nessas áreas. Agregados de plaquetas e filamentos de fibrina, quando presentes, concentram-se na cauda da distensão.

Ao colocar a lâmina no microscópio, deve-se decidir, em primeiro lugar, se ela é adequada ou não para exame. Distensão, fixação e coloração devem ser satisfatórias, e não deve haver alterações artefatuais produzidas por excesso de (EDTA) ou por estocagem prolongada. É imprudente fornecer um resultado com base no exame de uma distensão inadequada. Uma boa distensão deve ter uma área apreciável em que as células estejam dispostas em uma só camada, isto é, onde se toquem sem sobrepor-se. Os leucócitos devem estar distribuídos de maneira uniforme, sem se concentrar excessivamente ao longo das margens ou na cauda, como ocorre quando a distensão é muito delgada. Os granulócitos são encontrados preferencialmente ao longo das margens e na cauda da distensão, ao passo que os linfócitos ocupam, de preferência, o centro; nas distensões de boa qualidade, entretanto, a diferença não é grande.

Deve-se examinar a distensão à procura de possíveis agregados de plaquetas (Figura 3.5), que podem causar uma contagem de plaquetas falsamente baixa, ou de filamentos de fibrina (Figura 3.6), que indicam coagulação parcial da amostra, com

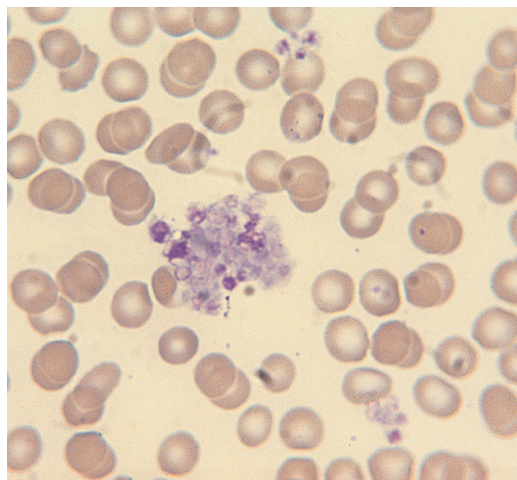


FIGURA 3.5 Agregado de plaquetas no sangue periférico. As plaquetas agregadas, que liberaram o conteúdo dos grânulos, mostram-se acinzentadas.

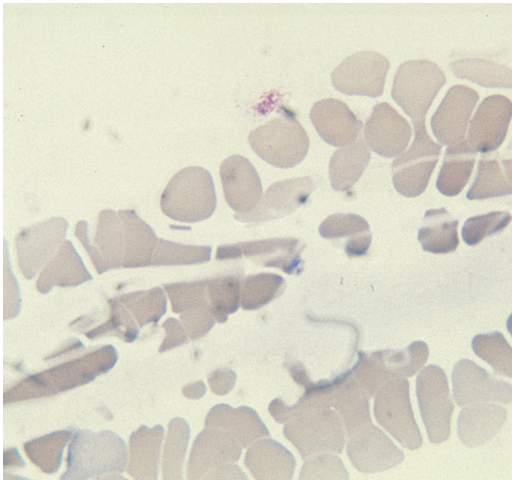


FIGURA 3.6 Filamentos de fibrina no sangue periférico de paciente portador de um estado de hipercoagulabilidade. Os filamentos de fibrina são levemente basófilos e causam deformação dos eritrócitos próximos. Filamentos de fibrina podem formar-se, também, quando houver coagulação parcial da amostra por dificuldade na punção venosa.

a probabilidade de que a contagem plaquetária e, possivelmente, outros parâmetros, não sejam válidos. Plaquetas que liberaram os grânulos após a agregação podem aparecer como massas de coloração azul-pálida, não identificáveis de imediato como plaquetas.

Alterações induzidas pelo armazenamento e outros artefatos

As distensões sanguíneas devem ser feitas sem demora após a coleta, mas laboratórios que recebem amostras enviadas pelo correio, ou transportadas de local distante, devem estar conscientes das alterações induzidas pela conservação do sangue *in vitro*. O armazenamento prolongado do sangue anticoagulado com EDTA causa perda da área clara central dos eritrócitos – assemelhando-os a esferócitos [2] –, crenação ou alterações equinocíticas dos eritrócitos, degeneração dos neutrófilos (Figura 3.7) e lobulação do núcleo de alguns linfócitos (Figura 3.8). Excesso de EDTA pode, por si só, provocar crenação dos eritrócitos e acelerar o desenvolvimento das alterações de estocagem. Neutrófilos em degeneração podem ter aspecto semelhante ao de neutrófilos apoptóticos, formados *in vivo* (ver Figura 3.103), ou ser completamente amorfos. Se a amostra de sangue levar muito tempo para chegar ao laboratório – por exemplo, 3 dias ou mais –, a maioria dos neutrófilos sofrerá degeneração, com consequente diminuição da contagem de leucócitos.

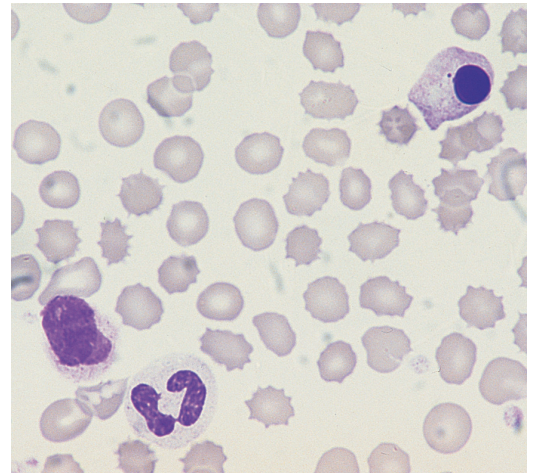


FIGURA 3.7 Distensão de sangue mostrando artefato de armazenamento: crenação (equinocitose), uma célula desintegrada e um neutrófilo com núcleo picnótico redondo.

Se o laboratorista inexperiente não reconhecer o artefato de estocagem e fizer uma contagem diferencial, haverá neutropenia e linfocitose espúrias. Observadores inexperientes podem cometer o erro de classificar os neutrófilos com uma única massa nuclear arredondada como eritrócitos nucleados (eritroblastos). A estocagem também causa alterações artefatuais nos demais componentes nas contagens automatizadas.

Uma alteração artefactual incomum é a produzida pelo aquecimento accidental das amostras – por exemplo, quando transportadas em um veículo

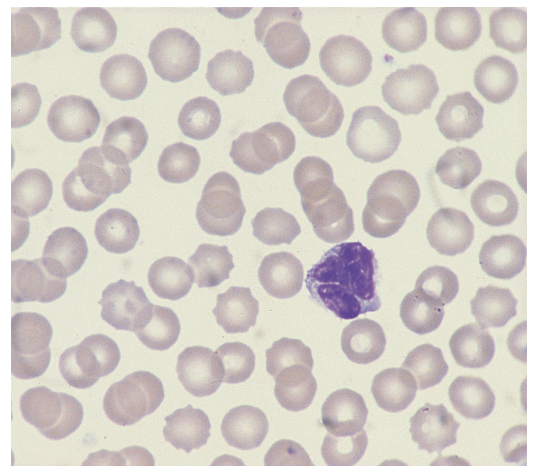


FIGURA 3.8 Distensão de sangue mostrando artefato de estocagem: discreta crenação e lobulação do núcleo de um linfócito.

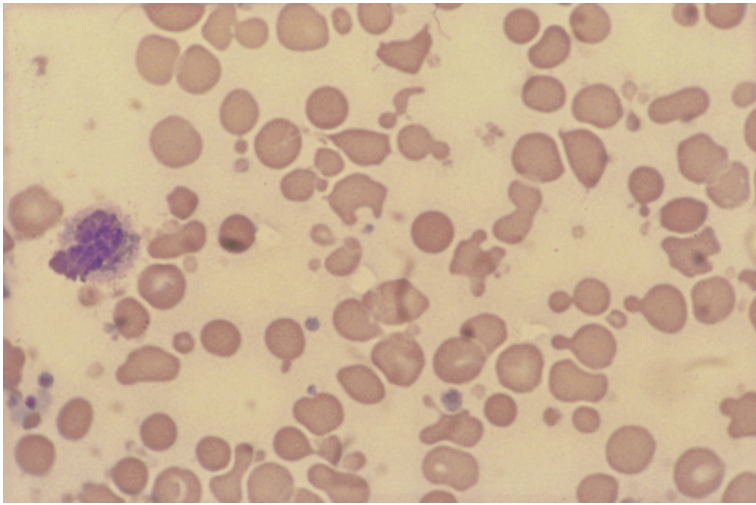


FIGURA 3.9 Distensão feita com uma amostra de sangue transportada dentro de um veículo excessivamente quente, mostrando brotamento e fragmentação dos eritrócitos.

muito quente [3]. Isso provoca grosseira fragmentação dos eritrócitos (Figura 3.9), que pode ser confundida com a piropecilocitose hereditária.

Artefatos podem ser decorrentes do uso de medicamentos intravenosos. Por exemplo, o óleo de rícino polietoxilado, usado para solubilizar o antitumoral paclitaxel, causa grandes áreas claras entre as células, *rouleaux* e agregados de eritrócitos [4].

Se a distensão for considerada adequada para exame, o passo seguinte é avaliar sistematicamente todos os tipos de células e a coloração de fundo. Aumento da coloração de fundo costuma dever-se a aumento de imunoglobulinas, tanto policlonais como monoclonais. Anormalidades que podem ser vistas entre as células incluem cristais

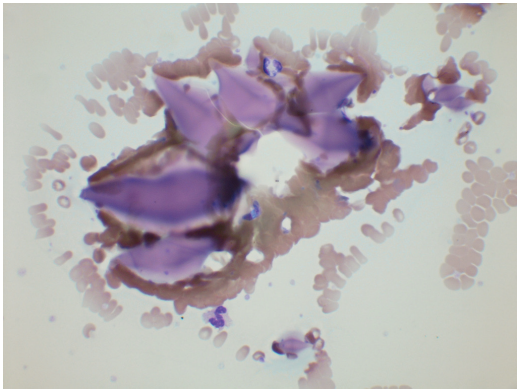


FIGURA 3.10 Campo em pequeno aumento de distensão de sangue mostrando grandes cristais de crioglobulina.

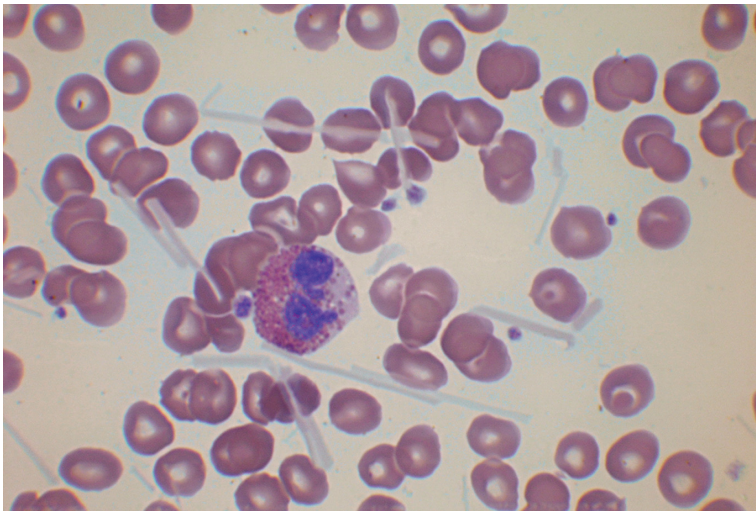
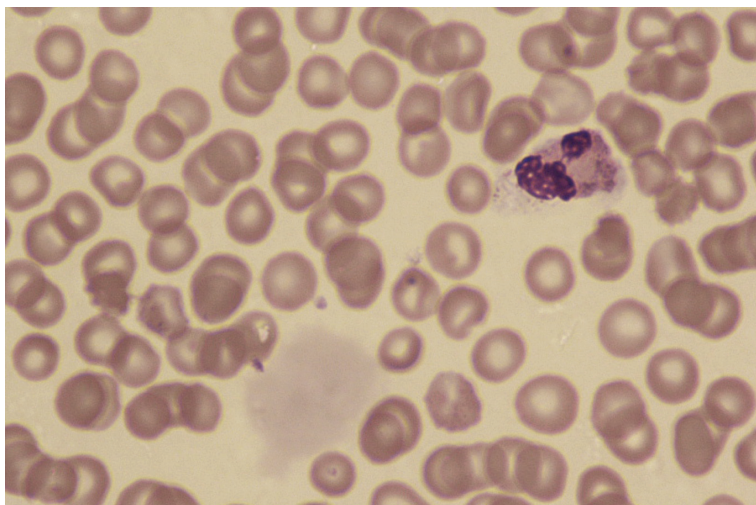


FIGURA 3.11 Distensão de sangue mostrando cristais de crioglobulina. Cortesia do Dr. Poormina Kumar, Londres.

FIGURA 3.12 Distensão de sangue mostrando um depósito amorfo de crioglobulina; há também crioglobulina fagocitada dentro do neutrófilo.

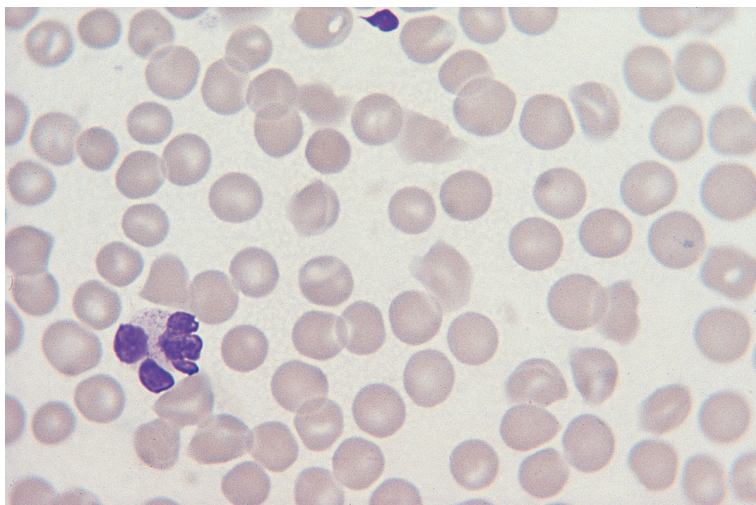


de crioglobulina monoclonal [5, 6] (Figuras 3.10 e 3.11), depósitos de crioglobulina amorfa (Figura 3.12) e depósitos amorfos ou fibrilares que representam mucopolissacarídeos anormais que circulam no sangue de pacientes com doenças malignas [7].

Devem ser comparados os aspectos à microscopia com o hemograma fornecido pelo contador eletrônico, para decidir se a contagem de leucócitos, a hemoglobina (Hb), o volume corpuscular médio (VCM) e a contagem de plaquetas são compatíveis com o que se vê na distensão, ou se existe alguma incongruência que invalide o conjunto. Quando as contagens e o que se vê na distensão são incompatíveis, deve-se inspecionar a amostra de sangue, repetir as contagens e, se necessário, distender nova lâmina. Tais

discrepâncias podem ter como causa: (i) homogeneização incompleta ou coagulação parcial da amostra; (ii) volume de sangue insuficiente, no tubo, resultando na aspiração de volume inadequado pelo instrumento; ou (iii) contagens eletrônicas feitas em uma amostra de sangue e distensão feita com outra amostra. Excluídos tais erros técnicos, a discrepância pode resultar de uma anormalidade intrínseca da amostra, como hiperlipidemia ou presença de crioaglutininas. Suspeita-se de hiperlipidemia quando há eritrócitos de contornos borrados (Figura 3.13) e de crioaglutininas quando há conglomerados de eritrócitos aglutinados (Figura 3.14). O Capítulo 4 aborda a validação das contagens pela comparação com o exame da distensão e por outros meios.

FIGURA 3.13 Sangue periférico de um paciente com hiperlipidemia, mostrando eritrócitos deformados, com contornos imprecisos, e o borramento do contorno dos lóbulos de um neutrófilo, resultante da alta concentração lipídica.



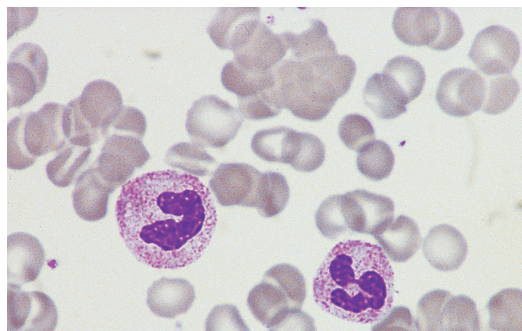


FIGURA 3.14 Eritrócitos aglutinados no sangue de paciente com título elevado de criaglutininas.

Eritrócitos

A maioria dos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos) normais tem formato de disco bicôncavo (Figura 3.15) [8]; uma minoria tem formato de tigela, com concavidade unilateral. Na distensão corada, apresentam um contorno aproximadamente circular, mostrando apenas pequenas variações quanto ao formato e moderada variação quanto ao tamanho (Figura 3.16). O diâmetro médio é de cerca de 7,5 μm . Na área da distensão em que as células formam uma camada única, uma área central mais pálida ocupa cerca de um terço da célula.

O formato e a flexibilidade normais do eritrócito dependem da integridade do citoesqueleto ao qual está ligada a membrana lipídica. O aparecimento de formatos anômalos pode resultar de um

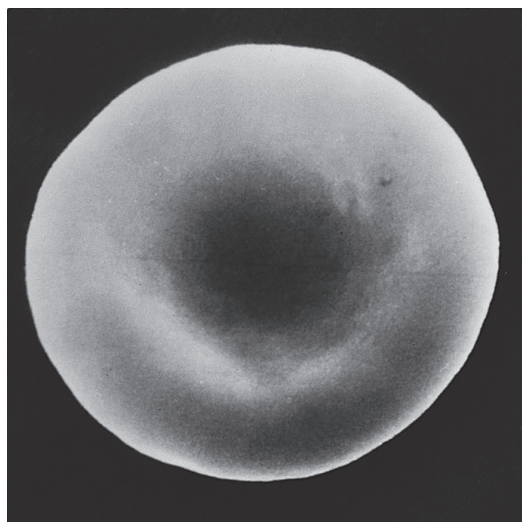


FIGURA 3.15 Micrografia com microscópio eletrônico de varredura de um eritrócito normal (discócito). Cortesia do Professor Aaron Polliack, Jerusalém, de Hoffbrand e Pettit [8].

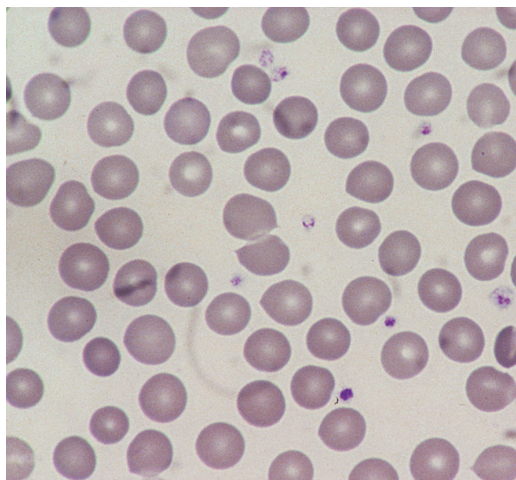


FIGURA 3.16 Sangue periférico de indivíduo sadio, mostrando eritrócitos e plaquetas normais. Os eritrócitos mostram pequena variação quanto ao formato e ao tamanho. Algumas das plaquetas têm grânulos espalhados pelo citoplasma, enquanto outras possuem um granulômero e um hialômero.

defeito primário do citoesqueleto ou da membrana, ou decorrer de fragmentação eritrocítica ou de polimerização, cristalização ou precipitação da hemoglobina. A membrana do eritrócito é constituída de dupla camada lipídica, atravessada por várias proteínas transmembrana, sendo as mais importantes a proteína 3 e as glicoforinas. A principal proteína do citoesqueleto é a espectrina; heterodímeros compostos pelas cadeias α e β da espectrina combinam-se em tetrâmeros que se ligam a outros tetrâmeros de espectrina, formando uma rede complexa. A rede do citoesqueleto liga-se à dupla camada lipídica da membrana por meio de interações da cadeia β da espectrina com a anquirina e a proteína transmembrana banda 3, bem como pelas interações das cadeias α e β da espectrina com a actina, a proteína 4.1 e a proteína transmembrana glicoforina C; a interação de anquirina e banda 3 é modulada pela proteína 4.2, ao passo que a interação entre espectrina e actina é estabilizada pela interação com a proteína 4.1 e a aducina (ver Figura 8.37) [9].

Certos termos usados para descrever a morfologia dos eritrócitos requerem definição. Para descrever as células normais, são utilizados dois adjetivos: (i) normocítico(a), que significa serem as células de tamanho normal; e (ii) normocrômico(a), que significa que as células contêm quantidade e concentração normais de hemoglobina, corando-se, portanto, normalmente. Outros termos descritivos pressupõem que a morfologia seja anormal e, por esse motivo, não devem ser empregados no hemograma para

descrever uma variação fisiológica normal. Por exemplo, no caso do recém-nascido, não se deve relatar a presença de eritrócitos “macrocíticos”, pois os eritrócitos do recém-nascido são, normalmente, maiores do que os do adulto. De modo similar, os eritrócitos de uma gestante sadia não devem ser descritos como apresentando “anisocitose” ou “pecilocitose” leves, já que isso é normal na gravidez. Poucos laboratórios adotam a política de descrever cada distensão normal como normocítica e normocrômica; a maioria comenta a morfologia eritrocitária apenas quando é anormal, ou se a normalidade for particularmente significativa para o caso. Qualquer política é aceitável, desde que seja aplicada com constância e desde que o corpo clínico esteja ciente. Se um paciente estiver anêmico e os eritrócitos forem normocíticos e normocrômicos, é útil chamar a atenção sobre isso, uma vez que limita as possibilidades diagnósticas.

Anisocitose

É um aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos que excede a observada no sangue de indivíduos saudáveis. É uma anormalidade inespecífica, mas comumente encontrada em distúrbios hematológicos. Nas contagens fornecidas por instrumentos automatizados, a variabilidade é medida pelo RDW (amplitude de distribuição dos eritrócitos) (ver Capítulo 2): o aumento é indicativo de anisocitose.

Microcitose

É a diminuição do tamanho dos eritrócitos. Eritrócitos microcíticos são notados na distensão sanguínea

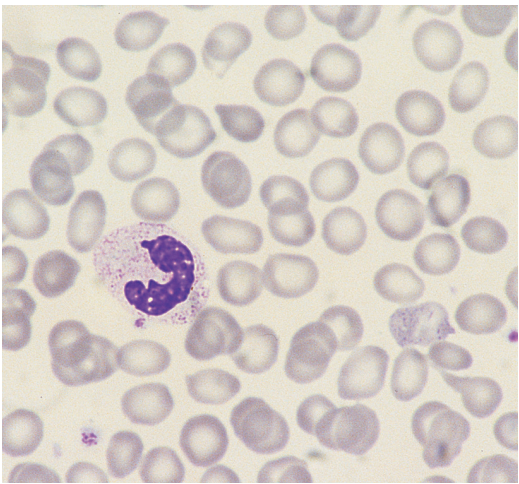


FIGURA 3.17 Microcitose em um paciente com β-talassemia menor, com VCM de 62 fL. A distensão sanguínea também mostra leve hipocromia, anisocitose e pecilocitose.

quando o diâmetro é inferior a 7–7,2 μm (Figura 3.17). O núcleo do linfócito pequeno, com diâmetro de aproximadamente 8,5 μm, é um guia útil na avaliação do tamanho dos eritrócitos. A microcitose pode ser geral ou pode haver apenas uma parte da população microcítica. Se todos (ou quase todos) os eritrócitos forem pequenos, haverá uma redução significativa do VCM, mas uma pequena população microcítica pode estar presente sem que o VCM diminua abaixo dos limites de referência. Algumas causas de microcitose são listadas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 Algumas causas de microcitose

Hereditárias
Heterozigose para a β-talassemia (β-talassemia menor ou traço β-talassêmico)
Homozigose ou heterozigose composta para a β-talassemia (β-talassemia maior ou intermédica)
Homozigose e heterozigose para δβ ou γδβ-talassemia e homozigose para δβ-talassemia
Homozigose e heterozigose para hemoglobina Lepore
Homozigose e alguns casos de heterozigose (p. ex., devida à mutação inativando KLF1) para persistência hereditária de hemoglobina fetal
Heterozigose para α ⁰ -talassemia
Homozigose para α ⁺ -talassemia ou, menos intensa, heterozigose
Heterozigose para hemoglobina Constant Spring, hemoglobina Pakse e hemoglobina Quong Sze
Hemoglobinopatia H
Heterozigose para hemoglobina S (traço drepanocítico) [10, 11] (com discordâncias, ver Capítulo 8)
Heterozigose [10, 11] e homozigose para hemoglobina C
Drepanocitose/hemoglobinopatia C [12]
Heterozigose [13] e homozigose [14] para hemoglobina E
Heterozigose para hemoglobina D ^{Punjab} (D ^{Los Angeles})
Heterozigose para outras hemoglobinas anômalas raras, produzindo condições semelhantes à talassemia (p. ex., hemoglobina Tak, hemoglobina Indianápolis)
Anemia sideroblástica congênita
Atransferrinemia
Deficiência de ferroquelatase (porfíria eritropoética) [15]
Porfíria hepatoeritropoética [16]

(continua)

TABELA 3.1 Algumas causas de microcitose (*Continuação*)

Associada com excesso de ferro mas sem ferro na medula óssea [17]
Associada com eliptocitose [18]
Piropecilocitose hereditária (devida à fragmentação eritrocitária)
Má absorção hereditária de ferro mais defeito na incorporação do ferro [19]
Aceruloplasminemia [20]
Deficiência de cobre [21]
Deficiência de hemoxigenase [22]
Homozigose [23] ou heterozigose composta [24] para o gene <i>SLC11A2</i> codificando o transportador divalente de metais 1
Homozigose para a mutação no gene <i>GLRX5</i> codificando glutarredoxina [25] (um paciente)
Mutação bialélica no gene <i>TMPRSS6</i> (causando anemia ferropênica refratária ao ferro) [26]
Síndrome Majeed (anemia diseritropoética congênita com osteomielite e dermatose, devida à mutação <i>LPIN2</i>) [27]
Adquiridas
Deficiência de ferro (incluindo deficiência medular de ferro na hemossiderose pulmonar)
Anemia das doenças crônicas
Síndromes mielodisplásicas, particularmente, mas não exclusivamente, quando associadas à doença da hemoglobina H adquirida [28]
Anemia sideroblástica adquirida secundária (p. ex., a causada por várias drogas; alguns casos de intoxicação por chumbo e alguns casos de deficiência de cobre [29] ou de excesso de zinco com deficiência funcional de cobre, como a ingestão de moedas contendo zinco como aspecto de doença mental [30–32]; hiperzincemia com hipercalprotectinemia (natureza da anemia não especificada) [33])
Hipertireoidismo [34]
Deficiência de ácido ascórbico (raramente) [35]
Intoxicação por cádmio [36]
Intoxicação por alumínio
Anticorpo contra o receptor eritroblástico de transferrina [37]

Os eritrócitos na infância são menores do que os dos adultos, ao passo que os do recém-nascido são muito maiores, de modo que o VCM deve ser interpretado de acordo com a idade do indivíduo. Microcitose é incomum no recém-nascido, mas pode ocorrer em distúrbios α -talassêmicos e na deficiência de ferro resultante de perda sanguínea intrauterina; é possível que também haja microcitose ao nascimento na anemia sideroblástica congênita e na atransferrinemia. Os negros têm eritrócitos menores do que os dos brancos; é provável que isso se deva à alta prevalência do traço α -talassêmico, e à prevalência inferior, mas ainda significativa, do traço β -talassêmico, do traço da hemoglobina C e de outras hemoglobinopatias associadas à microcitose, e não a uma diferença étnica intrínseca no tamanho do eritrócito.

Macrocitose

É o aumento do tamanho dos eritrócitos. Os eritrócitos do recém-nascido são acentuadamente macrocíticos em relação aos do adulto; os eritrócitos fetais também são maiores do que os do adulto. Uma discreta macrocitose é uma das características fisiológicas da gravidez [38], também encontrada em idosos [39].

A macrocitose é notada na distensão sanguínea pelo aumento do diâmetro celular (Figura 3.18). Ela poderá ser geral, e nesse caso o VCM

estará elevado, ou poderá afetar apenas uma parte da população de eritrócitos. Os macrocitos podem ter contorno redondo ou oval, com significado diagnóstico diferente nas duas situações. Algumas causas de macrocitose estão listadas na Tabela 3.2.

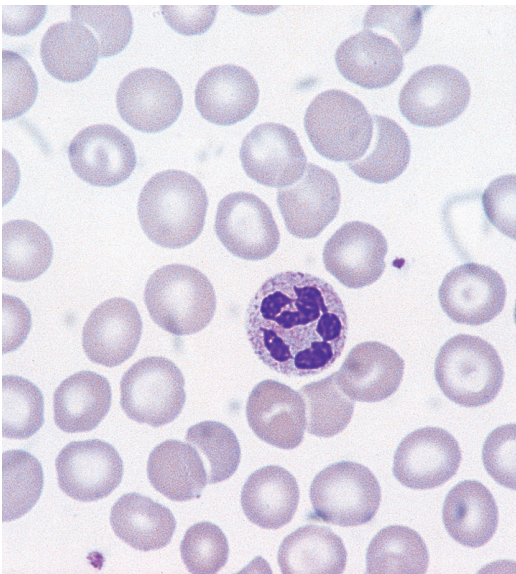


FIGURA 3.18 Macrocitose associada à doença hepática, com VCM = 105 fL. Notam-se, também, vários eritrócitos em alvo (*target cells*).

TABELA 3.2 Algumas causas de macrocitose

Associadas com reticulocitose	
Anemia hemolítica	
Hemorragia recente	
Associadas com eritropoese megaloblástica	
Deficiência de vitamina B ₁₂ e inativação da vitamina B ₁₂ pela exposição crônica ao óxido nítrico	
Deficiência de ácido fólico, fármacos antifólicos (metotrexato, pentamidina, pirimetamina e trimetoprima e incluindo metotrexato intratecal [40]), abuso de compostos para tosse [41]	
Escorebuto	
Fármacos que interferem na síntese de DNA – usados no tratamento de câncer, como agentes imunossupressores, e no tratamento da aids (incluindo doxorrubicina, daunorrubicina, azatioprina, mercaptopurina, ciclofosfamida, citarabina, fluorouracil, hidroxicarbamida, procarbazina, tioguanina, zidovudina e estavudina)	
Tratamento com imatinibe ou sunitinibe (não apenas por deficiência de vitamina B ₁₂) [42, 43]	
Defeitos raros da síntese de DNA (incluindo acidúria orótica, anemia responsiva à tiamina, síndrome de Wolfram – também chamada DIDMOAD = <i>Diabete Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy and Deafness</i> – e síndrome de Lesch-Nyhan)	
Associadas com eritropoese megaloblástica ou macronormoblástica	
Síndromes mielodisplásicas, incluindo anemia refratária com sideroblastos em anel	
Algumas leucemias mieloides agudas	
Mieloma múltiplo e gamopatia monoclonal de significação obscura (MGUS) [44]	
Ingestão continuada de álcool	
Doença hepática	
Tratamento com fenitoína	
Alguns casos de deficiência de cobre [45]	
Intoxicação por arsênico [46]	
Macrocitose familiar (?) [47]	
Associadas com eritropoese macronormoblástica	
Algumas anemias diseritropoéticas congênitas, particularmente a tipo I	
Aplasia eritroblástica pura da infância (síndrome de Blackfan-Diamond), incluindo uma forma frusta somente com macrocitose [48]	
Anemia aplástica	
Anemia sideroblástica herdada pelo lado materno [49]	
Síndrome de Pearson	
Anorexia nervosa [50]	
Hemocromatose genética [51]	
Sinartese eritroblástica [52]	
Mecanismo incerto	
Tabagismo [39]	
Doença broncopulmonar obstrutiva crônica	
Trissomia 18 [53]	
Trissomia 21 (síndrome de Down) [53, 54]	
Triploidia [53, 55]	
Distúrbio autoimune/linfoproliferativo familiar [56]	
Desenvolvimento de anticorpos a trombopoetina [57]	
Espúria	
Crioaglutininas	
Demora da determinação do VCM em alguns casos de estomatocitose hereditária, particularmente crio-hidrocitose [58]	
Grande demora na medida do VCM com alguns contadores automatizados (ver Capítulo 4)	

Hipocromia

É a redução da coloração do eritrócito (Figura 3.19); há um aumento da palidez central, que passa a ocupar área superior ao terço usual do diâmetro do eritrócito. A hipocromia pode ser geral ou pode existir uma população de células hipocrômicas. A hipocromia severa poderá refletir-se em uma redução da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), mas a sensibilidade dessa medida à hipocromia depende do método de medição utilizado. Qualquer das condições que provocam microcitose pode causar hipocromia, embora em alguns indivíduos com traço de α ou β -talassemia a distensão sanguínea apresente microcitose sem hipocromia apreciável, e em raros pacientes com deficiência de cobre a hipocromia esteja associada à macrocitose [45]. Eritrócitos de crianças saudáveis são frequentemente hipocrômicos, quando comparados com os

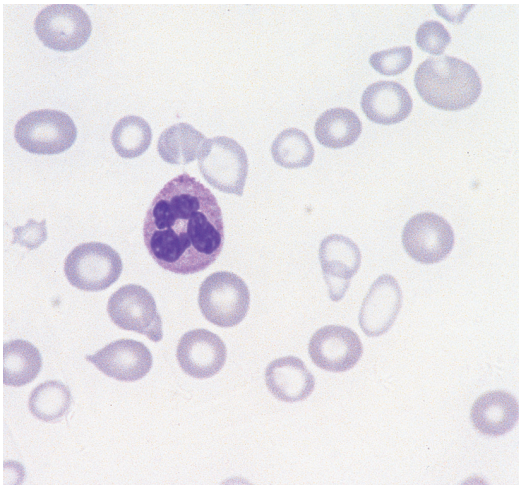


FIGURA 3.19 Eritrócitos hipocrômicos em paciente com anemia ferropênica. Há também anisocromia.

de adultos. Uma vez que a intensidade da coloração dos eritrócitos à observação microscópica é determinada não só pela concentração de hemoglobina, mas também pela espessura da célula, a hipocromia também pode ser notada em células que sejam mais delgadas do que as normais, mesmo com volume e concentração de hemoglobina normais; tais células são denominadas “leptócitos”.

Hipercromia

O termo “hipercromia” é raramente usado na descrição de distensões sanguíneas. Ele pode ser aplicado quando as células se coram com intensidade maior do que a normal, mas é mais útil para indicar por que a célula é hipercrômica. Esferócitos e eritrócitos irregularmente contraídos coram-se mais intensamente do que eritrócitos normais; a CHCM pode estar aumentada, indicando que a hipercromia relaciona-se não apenas com a alteração no formato da célula, mas também com um verdadeiro aumento na concentração de hemoglobina. Alguns macrócitos são mais espessos do que os eritrócitos normais e, por isso, hipercrômicos, sem que exista um aumento na concentração de hemoglobina; a palidez central pode estar ausente.

Anisocromia

Anisocromia (ou anisocromasia) descreve uma variabilidade excessiva no grau de coloração ou de hemoglobinizacão dos eritrócitos (ver Figura 3.19). Na prática, significa um espectro de coloração que se estende desde a hipocromia até a normocromia. A anisocromia indica, comumente, uma situação de mudança, como a progressão de anemia ferropênica ou de anemia de doença crônica, ou durante a resposta de ambas ao tratamento. A anisocromia é expressa pelo aumento da amplitude de distribuição de hemoglobina (HDW) medida por alguns instrumentos automatizados.

Dimorfismo

Dimorfismo significa a presença de duas populações distintas de eritrócitos (Figura 3.20). O termo aplica-se, na maioria das vezes, à presença concomitante de uma população de células hipocrômicas microcíticas e outra de células normocrômicas, normocíticas ou macrocíticas. Como o termo é geral, é necessário descrever as duas populações. Os eritrócitos das populações podem diferir quanto ao tamanho, ao formato ou ao conteúdo de hemoglobina, o que é importante para o diagnóstico diferencial. Os contadores automatizados poderão confirmar a impressão visual de dimorfismo,

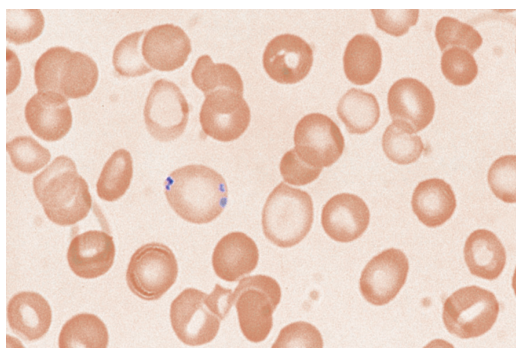


FIGURA 3.20 Aspecto dimórfico do sangue de paciente com anemia sideroblástica decorrente de síndrome mielodisplásica. Uma população celular é normocítica e normocrômica, outra é microcítica e hipocrômica. Um dos eritrócitos pouco hemoglobinizados contém corpúsculos de Pappenheimer.

embora alguns instrumentos não sejam capazes de distinguir a diferença em tamanho da diferença na concentração da hemoglobina. As causas de aspecto dimórfico incluem anemia ferropênica (após administração de ferro ou transfusão de sangue), anemia sideroblástica, condição heterozigótica para anemia sideroblástica hereditária, anemia macrocítica após transfusão, deficiência simultânea de ferro e de vitamina B₁₂ ou ácido fólico, desmascaramento da deficiência de ferro após tratamento da anemia megaloblástica, e reações transfusionais tardias. Causa raras são: mosaïcismo para β -talassemia menor, associado a uma anomalia cromossômica constitucional [59], e quimerismo após transplante de células-tronco quando o doador ou o receptor tem uma causa genética de microcitose.

Policromatofilia

O termo policromatofilia (policromasia ou policromatocitose) descreve eritrócitos que têm coloração róseo-azulada, em consequência da captação simultânea de eosina (pela hemoglobina) e de corantes básicos (por RNA ribossômico residual). Como os reticulócitos são células cujo RNA ribossômico toma corantes supravitais, formando um retículo visível, há um relacionamento entre reticulócitos e eritrócitos policromáticos. Ambos são eritrócitos imaturos, recém-saídos da medula óssea, mas a porcentagem de eritrócitos policromáticos no sangue normal, inferior a 0,1% [60], é consideravelmente menor do que a contagem normal de reticulócitos, cerca de 1-2%; em amostras de pacientes, a contagem de reticulócitos é em média o dobro da estimativa visual de eritrócitos policromáticos [61]. Isso ocorre porque apenas os reticulócitos mais imaturos



FIGURA 3.21 Microscopia eletrônica de varredura de um reticulócito. Cortesia do Professor Aron Polliack, de Hoffbrand e Pettit [8].

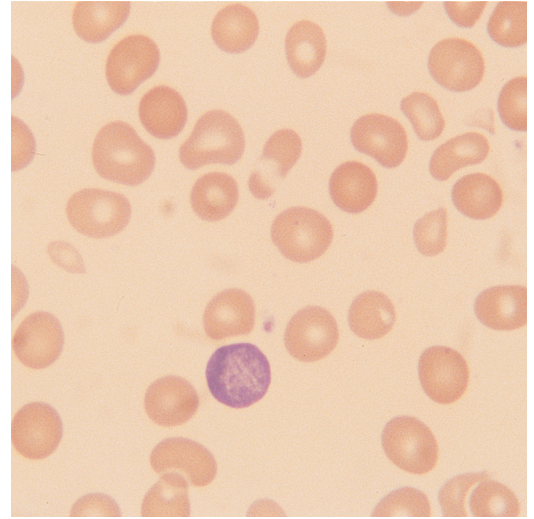


FIGURA 3.22 Eritrócito policromático, maior do que os normais, que pode ser denominado macrócito policromático. Há também anisocitose e pecilocitose.

(grau I) são policromáticos. Em condições de estresse hematopoético transitório ou persistente, quando há altos níveis de eritropoetina, são liberados da medula óssea reticulócitos imaturos. Estes têm diâmetro médio 28% superior aos dos eritrócitos maduros [60] com concentração hemoglobínica consequentemente inferior, o que os torna menos densos. À microscopia eletrônica de varredura, apresentam superfície irregular, multilobulada (Figura 3.21). São facilmente notados nas distensões coradas com

May-Grünwald-Giemsa (MGG), pelo diâmetro aumentado, pela ausência de palidez central, assim como pelo aspecto policromático (Figura 3.22), e são designados como “macrócitos policromáticos”. Às vezes, o formato irregular visto ao microscópio eletrônico pode também ser discernido ao microscópio óptico (Figura 3.23). Reticulócitos tardios, únicas formas presentes no sangue de indivíduos hematologicamente normais, têm formato de tigela (conca-vidade unilateral) e são apenas ligeiramente maiores

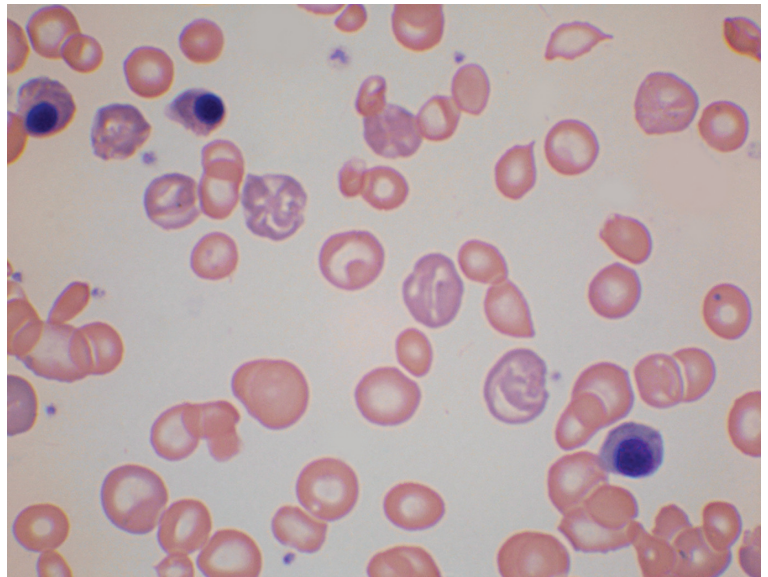


FIGURA 3.23 Distensão de sangue de paciente com anemia de células falciformes, mostrando macrócitos policromáticos com a notável irregularidade de formato dos reticulócitos; há, também, eritroblastos.

do que os eritrócitos maduros, o que dificulta a identificação em distensões coradas com MGG.

O número total de reticulócitos, a proporção de reticulócitos precoces e o número de macrócitos policromáticos aumentam como resposta fisiológica ao aumento da altitude e a outros estímulos hipóxicos, e como resposta normal à anemia, quando não houver fatores que limitem a eritropoese. Em pacientes gravemente anêmicos, a inexistência de policromatocitose é significativa de inadequada resposta eritropoética: está ausente na aplasia eritroide pura e na anemia aplástica e é imperceptível na anemia das doenças crônicas e na insuficiência renal, casos em que a resposta eritropoética é inadequada. A ausência de policromatocitose em um paciente com anemia de células falciformes (drepanocitose), ou outra anemia hemolítica, é relevante, pois pode ser indicativa de aplasia eritroide induzida por parvovírus B19.

Eritrócitos policromáticos estão aumentados no sangue em casos de mielofibrose e de carcinoma metastático da medula óssea. Em tais condições, o número de células policromáticas é maior do que o esperado para o grau de anemia, e as células policromáticas podem ser mais intensamente basófilas do que as normais e nem sempre de tamanho aumentado [36].

Quando a contagem de reticulócitos está aumentada, os contadores automatizados mostram aumento do VCM e do RDW. Os contadores da série Bayer H.1 (e Advia subsequentes) mostram, além disso, um aumento do HDW, sendo os reticulócitos

vistos como macrócitos hipocrômicos no citograma eritrocitário (ver Figura 8.65).

Pecilocitose

Um eritrócito de formato anormal é um pecilócito. Diz-se haver pecilocitose (ou poiquilocitose) quando há um número exagerado de eritrócitos de formato anormal. A altitude elevada produz certo grau de pecilocitose em pessoas hematologicamente normais [62]. A pecilocitose é também uma anormalidade comum, frequentemente inespecífica, encontrada em vários distúrbios hematológicos; pode resultar da produção de eritrócitos anormais pela medula óssea, ou de dano às células após liberação na corrente sanguínea. Quando a pecilocitose é extrema, as possibilidades diagnósticas incluem mielofibrose, anemias diseritropoéticas congênicas e adquiridas, anemias megaloblásticas, piropecilocitose hereditária (Figura 3.24) e doença da hemoglobina H (Figura 3.25). Pecilocitose extrema, com microcitose, foi notada em uma criança com heterozigose composta para uma mutação DMT1 [24]. Pacientes com doença de Gaucher apresentam uma proporção aumentada de pecilócitos, 2,9% em comparação com 1% em controles, predominando a presença de dacríócitos, eliptócitos, equinócitos e esquizócitos [63].

A presença de pecilócitos com certas formas específicas – por exemplo, esferócitos ou eliptócitos – pode ter um significado especial (ver a seguir).

É importante não confundir deformações dos eritrócitos por uma anormalidade plasmática com

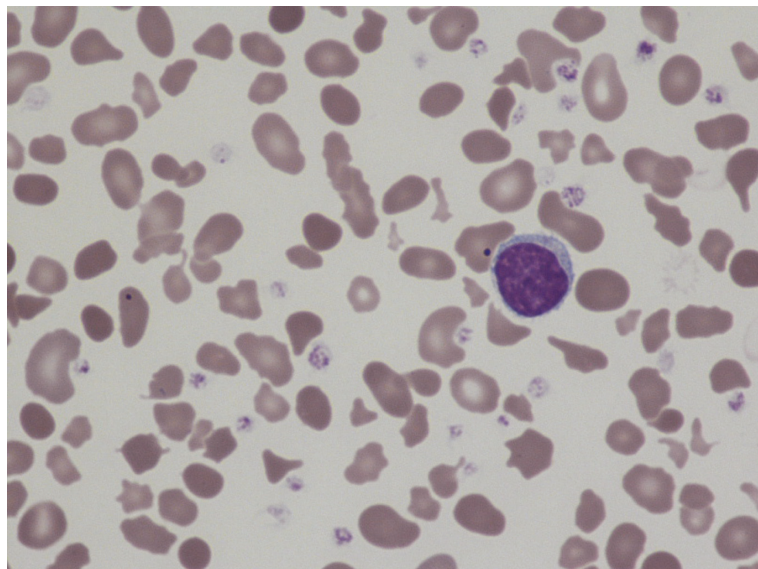
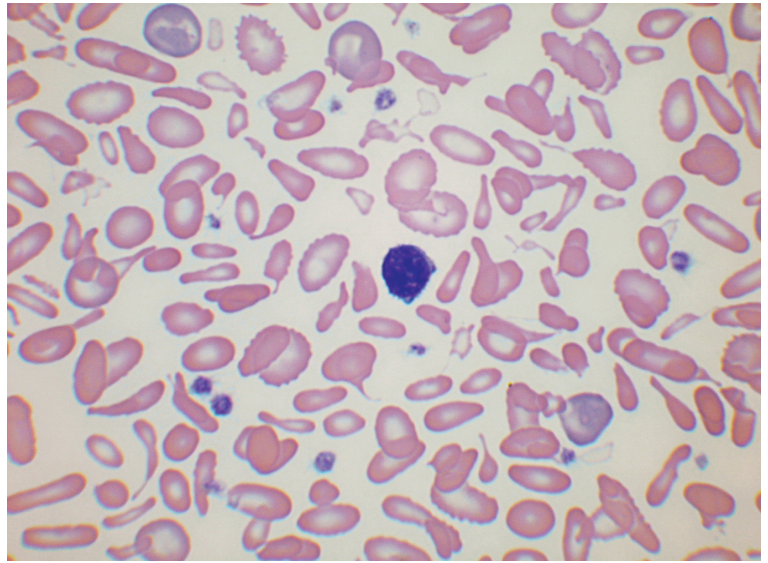


FIGURA 3.24 Distensão de sangue mostrando considerável pecilocitose em paciente com piropecilocitose hereditária. Agradecimentos ao Dr. Mike Leach, Glasgow.

FIGURA 3.25 Distensão de sangue mostrando considerável pecilocitose em paciente que herdou simultaneamente eliptocitose e o genótipo de doença de hemoglobina H ($\alpha^{TSaudi}\alpha/\alpha^{TSaudi}\alpha$). Eliptócitos são chamativos entre os numerosos pecilócitos. A distensão também mostra alguns macrócitos policromáticos.



pecilocitose verdadeira. A presença de crioglobulinas pode causar marcada deformação dos eritrócitos (Figura 3.26). Como a crioglobulina é fracamente basófila, não é notada com facilidade; a aparência de eritrócitos estranhamente indentados fornece uma pista.

Esferocitose

Esferócitos são eritrócitos que têm formato esférico, ou aproximadamente esférico, em vez de discóide (Figura 3.27) [64]. São células que perderam

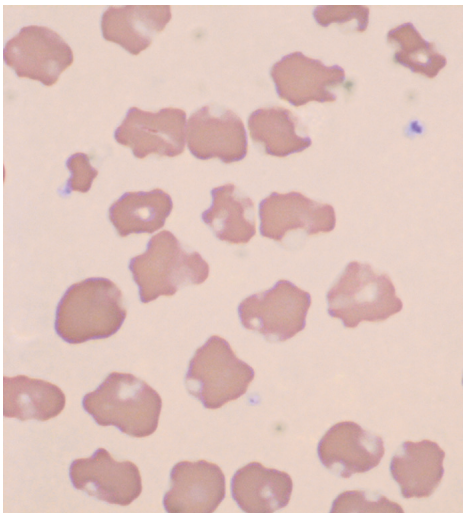


FIGURA 3.26 Distensão de sangue mostrando deformação dos eritrócitos por um precipitado de crioglobulina.

membrana sem perda equivalente de citosol, em consequência de anormalidades herdadas ou adquiridas do citoesqueleto e da membrana. Nas distensões coradas, os esferócitos não apresentam a palidez central normal. O diâmetro de uma esfera é menor do que o de um objeto discoide do mesmo volume, e, por isso, o esferócito parece menor do que o discócito. Assim, o termo “microesferócito” deve ser restrito aos esferócitos com volume reduzido, sem aplicá-lo aos que têm somente o diâmetro reduzido. Macroesferócitos podem ser um aspecto da estomatocitose hereditária (variante super-hidratada); decorrem de inchaço osmótico da célula. Ao examinar uma distensão à procura de esferócitos, é importante pesquisar em áreas onde os eritrócitos apenas se tocam, já que a palidez central não é notada na área próxima à cauda da distensão. Esferócitos não se empilham em *rouleaux* como os discócitos normais. Eritrócitos sobrepostos podem parecer esferócitos.

É importante estabelecer a distinção entre esferócitos e células irregularmente contraídas (ver a seguir), pois o significado diagnóstico é diferente.

Algumas causas de esferocitose são apresentadas na Tabela 3.3; há vários mecanismos subjacentes causais. Na esferocitose hereditária, há uma anormalidade do citoesqueleto, com desestabilização e perda secundária de membrana. A esferocitose adquirida pode resultar de dano direto à membrana dos eritrócitos, causado, por exemplo, pelo calor (Figura 3.28), pela toxina clostrídica (Figura 3.29) ou por veneno ofídico. A perda de membrana pode resultar da cobertura da célula por aloanticorpos (Figura

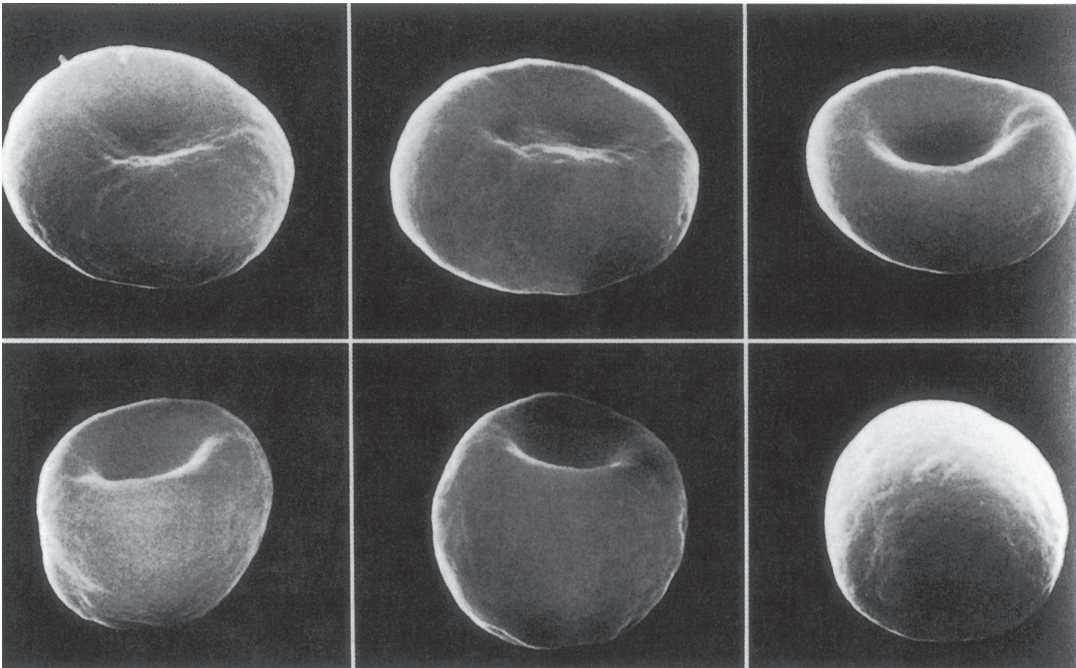


FIGURA 3.27 Micrografia eletrônica de varredura dos esferócitos e formas intermediárias entre discócitos e esferócitos. De Bessis [64].

TABELA 3.3 Algumas causas de esferocitose

Condições que podem estar associadas à presença de numerosos esferócitos	Condições que podem estar associadas a pequeno número de esferócitos
Esferocitose hereditária	<i>Como um aspecto isolado</i>
Anemia hemolítica autoimune com anticorpos quentes	Reação transfusional imediata
Reações transfusionais tardias	Anemia hemolítica autoimune aguda por crioaglutininas
Doença hemolítica ABO do recém-nascido, e com menor número de esferócitos, doença hemolítica Rh do feto e recém-nascido	Doença crônica por crioaglutininas
Administração de imunoglobulina anti-Rh para pacientes Rh-positivos (p. ex., no tratamento de púrpura trombocitopênica autoimune)	Anemia hemolítica induzida pela penicilina
Síndrome dos linfócitos passageiros após transplante de órgãos sólidos (p. ex., anticorpos anti-A, anti-B e anti-E)	Crises de hemoglobinúria paroxística a frio
Anemia hemolítica induzida por drogas pelo mecanismo de espectador inocente	Infusão intravenosa de grandes volumes de lipídio [68]
Sepse por <i>Clostridium perfringens</i>	Deficiência de pirimidina 5'-nucleotidase** [69]
Síndrome de Zieve*	<i>Em associação com outros pecilócitos</i>
Queda do ATP eritrocitário causada pela deficiência de fosfato [65, 66]	Recém-nascido normal
Hemólise induzida por picada de ofídios	Hipoesplenismo
Bartonelose (febre de Oroya)	Anemia de células falciformes
Afogamento em água doce, ou infusão intravenosa de água	Anemia hemolítica microangiopática (microesferócitos)
Queimaduras (microesferócitos)	Anemia hemolítica mecânica (microesferócitos)
Exposição a ácido sulfúrico (microesferócitos) [67]	Eliptocitose hereditária, com manifestações graves transitórias nos 2 primeiros anos de vida [70]
	Piropecilocitose hereditária (incluindo homozigose para mutações que causam eliptocitose hereditária)
	Fenótipo Rh nulo

ATP, trifosfato de adenosina.

*Eritrócitos irregularmente contraídos podem ser mais característicos.

**Os esferócitos podem ser espiculados.

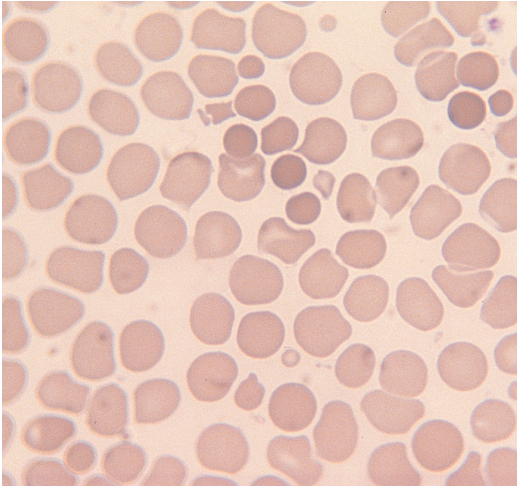


FIGURA 3.28 Sangue periférico de um paciente com queimaduras graves, mostrando esferócitos, microesferócitos e eritrócitos que parecem estar produzindo (*budding*) minúsculos fragmentos esferoides.

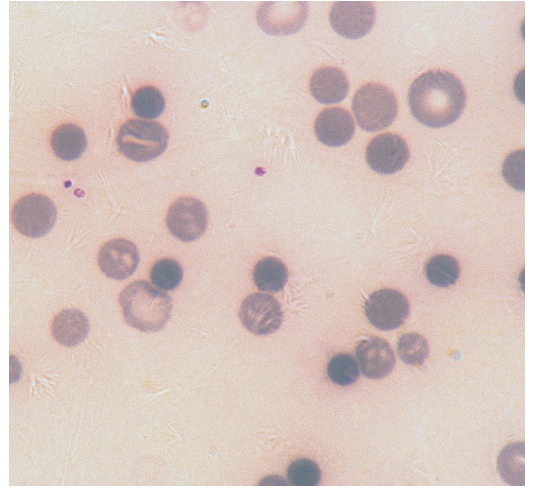


FIGURA 3.29 Sangue periférico de um paciente com septicemia clostrídica, mostrando vários esferócitos. Cortesia do falecido Professor Harry Smith.

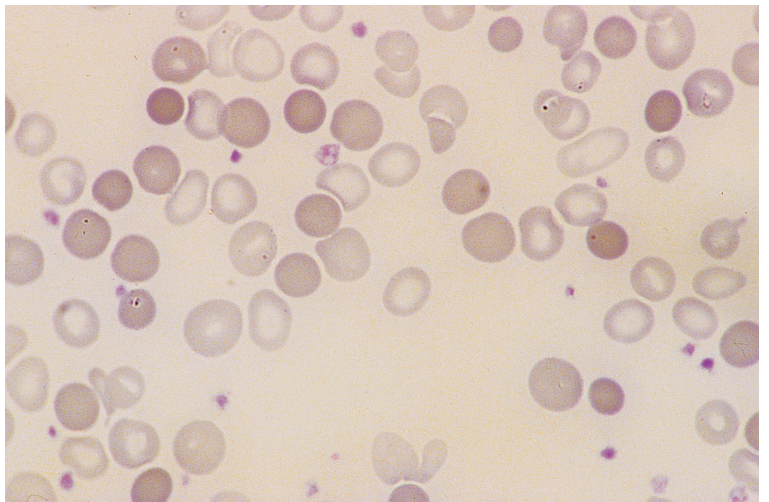
3.30), autoanticorpos ou anticorpos induzidos por drogas; os macrófagos do sistema reticuloendotelial reconhecem a imunoglobulina, ou o complemento, na superfície celular, e removem pedaços da membrana. Quando os eritrócitos se fragmentam, os fragmentos com relativa falta de membrana formam microesferócitos; este é o mecanismo da formação de esferócitos na anemia hemolítica microangiopática, na anemia hemolítica mecânica e na piropecilotose hereditária. Eritrócitos estocados para transfusão tornam-se esferoequinócitos à medida que o sangue envelhece (ver a seguir). A presença de esferocitose acentuada tem sido raramente descrita na

hipofosfatemia, por exemplo, nas hepatopatias [65], na cetoacidose diabética aguda [53] e durante tratamento corretivo excessivo de hiperfosfatemia [71]; é provável que o mecanismo responsável seja a depleção do trifosfato de adenosina (ATP). Nas anemias hemolíticas com corpos de Heinz, embora as células usuais sejam, na sua maioria, células irregularmente contraídas (ver a seguir), também estão presentes alguns esferócitos.

Eritrócitos irregularmente contraídos

Eritrócitos irregularmente contraídos não exibem palidez central, parecem menores e mais densos do

FIGURA 3.30 Esferócitos no sangue periférico de um paciente com deficiência de ferro que sofreu uma reação transfusional causada por anticorpo anti-Rh D; a distensão é dimórfica, mostrando a mistura de eritrócitos microcíticos hipocrômicos do receptor com os do doador, que se tornaram esferocíticos.



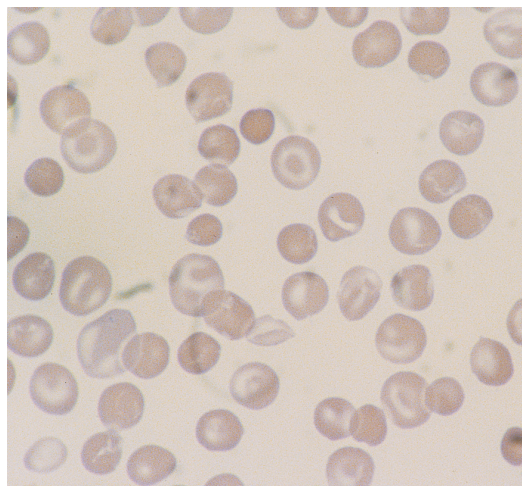


FIGURA 3.31 Sangue periférico de um paciente com hemoglobinopatia C mostrando eritrócitos irregularmente contraídos e vários eritrócitos em alvo (*target cells*).

que os normais, mas não têm formato regular como os esferócitos (Figura 3.31). Eritrócitos contraem-se irregularmente quando sofrem dano oxidativo, ou lesão à membrana pela precipitação de hemoglobina instável ou de cadeias α ou β livres. Distensões sanguíneas que mostram eritrócitos irregularmente contraídos frequentemente também mostram alguns esferócitos; estes são formados quando uma inclusão, como o corpo de Heinz, é removida pelos macrófagos esplênicos, com perda associada de parte da membrana do eritrócito. Queratócitos (ver a seguir) também costumam surgir quando há remoção de corpos de Heinz. Em distensões com eritrócitos irregularmente contraídos, em geral há também estromas e hemiestromas (*blister cells*), células em que a hemoglobina precipitou em um dos lados, deixando, no outro lado, as membranas apostas uma à outra. Corpos de Heinz podem estar presentes tanto na área clara como no resto da célula (Figuras 3.32 e 3.33) [72]. Condições correlacionadas com células irregularmente contraídas são apresentadas na Tabela 3.4.

Eliptocitose e ovalocitose

Os termos eliptocitose e ovalocitose indicam a presença, na distensão sanguínea, de número significativo de eliptócitos e de ovalócitos, respectivamente. Os termos não têm sido diferenciados de maneira uniforme; sugeriu-se, contudo, que fosse chamado de eliptócito o eritrócito cujo eixo maior supera o dobro do eixo menor, e de ovalócito o eritrócito cujo eixo maior é inferior ao dobro do eixo

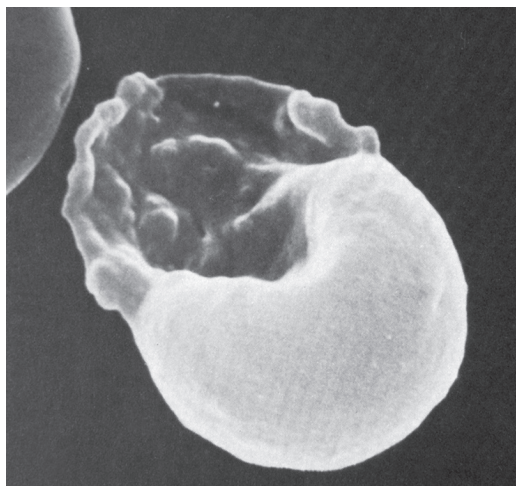


FIGURA 3.32 Fotografia com microscópio eletrônico de varredura mostrando um hemiestroma contendo corpos de Heinz. Cortesia do Dr. T.K. Chan e colaboradores, de Hong Kong, e do *British Journal of Haematology* [72].

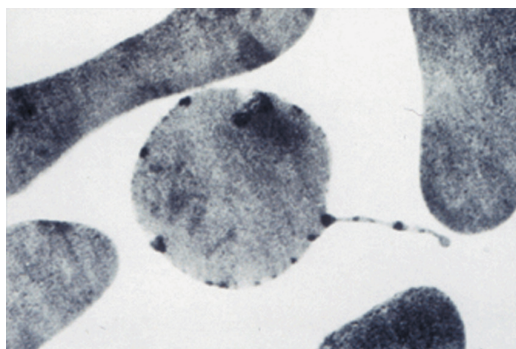


FIGURA 3.33 Fotografia com microscópio eletrônico de transmissão mostrando um hemiestroma contendo corpos de Heinz. Cortesia do Dr. T.K. Chan e colaboradores, de Hong Kong, e do *British Journal of Haematology* [72].

menor [75]. Quando eliptócitos ou ovalócitos são numerosos (Figura 3.34), é provável que o paciente tenha uma anomalia hereditária, afetando o citoesqueleto dos eritrócitos, como a eliptocitose hereditária. Um número menor de eliptócitos ou de ovalócitos pode ser visto na deficiência de ferro, em alguns pacientes com β -talassemia homozigótica e heterozigótica, na anemia megaloblástica, na mielofibrose, em síndromes mielodisplásicas (SMDs) e, às vezes, em anormalidades enzimáticas eritrocíticas hereditárias, como a deficiência de piruvatoquinase; supõe-se que, nessas condições, os ovalócitos reflitam diseritropoese. A eliptocitose nas SMDs foi correlacionada à deficiência adquirida de proteína 4.1 [76]. Em Papua-Nova Guiné, a ovalocitose, de

TABELA 3.4 Algumas condições associadas à presença de eritrócitos irregularmente contraídos

Condições que podem estar associadas a numerosos eritrócitos irregularmente contraídos
Hemoglobinopatia C
Hemoglobina C/β-talassemia
Hemoglobinopatia S/C
Hemoglobinas instáveis
Hemólise aguda na deficiência de G6PD, ou em outras anormalidades do <i>shunt</i> da pentose
Estresse oxidativo severo (drogas ou agentes químicos, por ex.; tratamento com dapsona ou intoxicação por sulfato de cobre) em pacientes sem anormalidades do <i>shunt</i> da pentose
Síndrome de Zieve
Doença de Wilson [73]
Condições que podem estar associadas a um pequeno número de eritrócitos irregularmente contraídos
Episódios hemolíticos menores na deficiência de G6PD
Estresse oxidativo moderado em pacientes sem anormalidades do <i>shunt</i> da pentose
Defeitos na biossíntese do glutatão
Deficiência neonatal de glutatão peroxidase (provavelmente secundária à deficiência transiente de selênio, um cofator essencial)
Traço da hemoglobinopatia C
Hemoglobinas instáveis
β-Talassemia menor
Hemoglobinopatia H
Traço ou hemoglobinopatia E
Xerocitose hereditária (variante desidratada da estomatocitose hereditária)
Anemia diseritropoética congênita tipo II [74]

G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase.

grande prevalência, está associada com negatividade de Gerbich e uma mutação específica no gene que codifica a glicoforina C [77]. Ovalócitos macrocíticos (macroovalócitos) são característicos da anemia megaloblástica e da ovalocitose do Sudeste Asiático; também são vistos na diseritropoese, por exemplo, na mielofibrose idiopática. Eliptócitos são bicôncavos e, portanto, capazes de formar *rouleaux*.

Em um grupo de pacientes tailandeses, notou-se que a ovalocitose faz parte de mutações homozigóticas no gene *SLC4A1*, que causa acidose tubular renal distal [78]. O gene codifica a proteína da membrana trocadora de ânions 1 (AE1) e a proteína AE1 mais curta encontrada nos túbulos renais. Homozigotos para a mutação G701D e heterozigotos compostos para G701D/A858D têm ovalócitos totalizando um quarto da população eritroide; esses pacientes têm hemólise compensada mas podem desenvolver anemia e reticulocitose durante períodos de acidose metabólica. Os heterozigotos compostos mostram, também, um pequeno número de eritrócitos pinçados e esquizócitos. Homozigotos e heterozigotos compostos, que são também heterozigotos para hemoglobina E, têm ovalócitos totalizando cerca de dois terços dos eritrócitos. Heterozigotos para G701D são hematologicamente normais, a menos que também tenham hemoglobina E ou α⁺-talassemia; nesse caso, apresentam ovalócitos. Entretanto, um heterozigoto para A858D tinha 20% de ovalócitos e também acantócitos, equinócitos e esquizócitos [78]. Um heterozigoto composto para G701D e deleção do mesmo gene que causa ovalocitose do Sudeste Asiático, e que também tinha α⁺-talassemia,

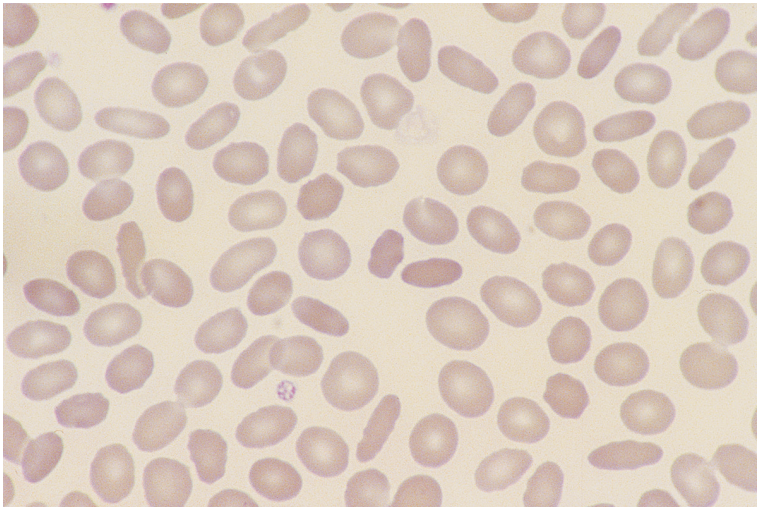


FIGURA 3.34 Sangue periférico de paciente com eliptocitose hereditária mostrando eliptócitos e ovalócitos.

apresentava anemia hemolítica agravada por acidose; os heterozigotos simples para ovalocitose do Sudeste Asiático não têm hemólise [78].

Eritrócitos em lágrima (dacriócitos)

Eritrócitos em formato de gota de lágrima ou pera (dacriócitos) (Figura 3.35) surgem quando há fibrose da medula óssea ou diseritropoese severa e, também, em algumas anemias hemolíticas. São característicos principalmente da anemia megaloblástica, da talassemia maior e da mielofibrose, tanto primária quanto secundária a carcinoma metastático ou a outro tipo de infiltração da medula óssea. Na talassemia maior e na mielofibrose idiopática, o número de dacriócitos diminui após a esplenectomia, sugerindo que eles resultam de hematopoese extramedular ou que sejam formados pelo dano subsequente aos eritrócitos anormais, causado pelo baço. Acredita-se que os dacriócitos presentes em casos ocasionais de anemia hemolítica autoimune [79] e nas anemias hemolíticas com corpos de Heinz resultem da ação dos macrófagos esplênicos sobre os eritrócitos anormais, removendo partes da célula, corpos de Heinz ou precipitados de cadeias α . Dacriócitos são comuns em pacientes com eritroleucemia [80].

Células espiculadas

A terminologia aplicada às células espiculadas é confusa. O termo *burr cell*, em particular, tem sido usado por diferentes autores para descrever diferentes células, portanto é melhor que seja abandonado. É recomendada a terminologia de Bessis [64], uma vez que se baseia em cuidadoso estudo de células anormais por microscopia eletrônica de

varredura, sendo clara e relativamente fácil de aplicar. Bessis dividiu as células espiculadas em equinócitos, acantócitos, queratócitos e esquizócitos.

Equinócitos

Equinócitos são eritrócitos que perderam o formato discoide e apresentam-se cobertos de 10 a 30 pequenas espículas rombudas, de forma e distribuição relativamente regulares (Figuras 3.36 e 3.37). As principais causas de equinocitose são apresentadas na Tabela 3.5. Equinócitos podem ser produzidos *in vitro*, pela exposição a ácidos graxos e a certas drogas, ou simplesmente por incubação. O estágio final da transformação discócito-equinócito é o esferoequinócito, o qual também se forma quando o esferócito sofre uma alteração equinocítica. Outros eritrócitos deformados, por exemplo, os acantócitos, podem sofrer alteração equinocítica similar.

Quando o sangue de um doador é estocado para transfusão, à medida que é formada a lisolecitina e que a concentração de ATP diminui, os eritrócitos tornam-se esferoequinócitos (Figura 3.38); lipídios da membrana, tanto colesterol quanto fosfolipídios, perdem-se junto com microvesículas contendo hemoglobina desprendidas das extremidades das espículas. Quando o sangue é transfundido e reinicia a síntese de ATP, muitas das células convertem-se em estomatócitos com formato de tigela, e não em discócitos; as que perderam uma porção significativa da membrana persistem esferocíticas.

A formação de equinócitos *in vivo* pode estar relacionada ao aumento dos ácidos graxos no plasma (como ocorre no tratamento com heparina), à depleção de ATP e à formação de lisolecitina. Durante

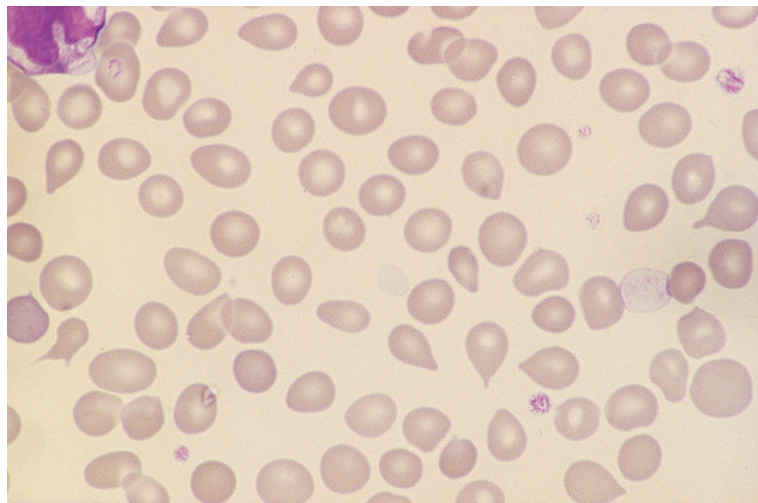


FIGURA 3.35 Sangue periférico de um paciente com mielofibrose idiopática mostrando picilócitos em formato de lágrima (dacriócitos).

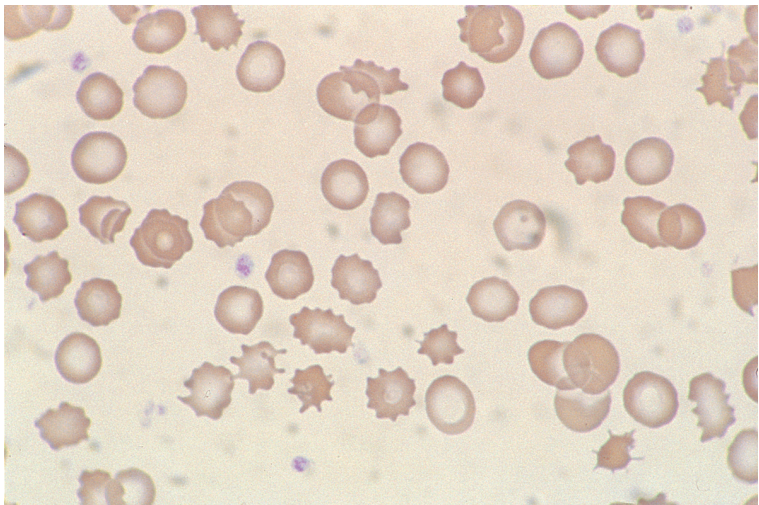


FIGURA 3.36 Equinócitos no sangue periférico de um paciente com insuficiência renal crônica.

a formação de equinócitos, há entrada de cálcio nas células, com polimerização da espectrina. A equinocitose é reversível *in vitro* e *in vivo*, suspendendo-se as células em plasma fresco, ou permitindo que o ATP seja novamente sintetizado.

Nos laboratórios que fazem as distensões com sangue anticoagulado* com EDTA em vez de sangue nativo, a causa mais comum de equinocitose é, sem dúvida, o atraso no procedimento (ver Figura 3.7). Esse artefato de estocagem, costumeiramente denominado “crenação”, é causado por queda

do ATP ou pela formação de lisolecitina. Equinocitose não decorrente de alteração artefactual é rara. A prevalência é maior em recém-nascidos [84]; equinócitos são normais em prematuros [85]. Pode ocorrer nas hepatopatias [84], mas acantocitose (ver a seguir) é mais comum. Pode ocorrer equinocitose nas fases iniciais da síndrome hemolítico-urêmica; subsequentemente desaparece, permanecendo apenas as características de anemia hemolítica microangiopática. Uma anemia hemolítica muito rara resultante de mutação em *SLC2A1* caracteriza-se por equinocitose [86]. A equinocitose não artefactual é particularmente comum em pacientes criticamente enfermos, com falência múltipla de órgãos, incluindo insuficiências hepática e renal. Em análise multivariada (principalmente refletindo insuficiência hepática e renal), equinocitose é preditiva de mortalidade em pacientes hospitalizados [87].

A equinocitose observada com o desenvolvimento de hipofosfatemia em pacientes

*N. de T. Praticamente todos no Brasil.

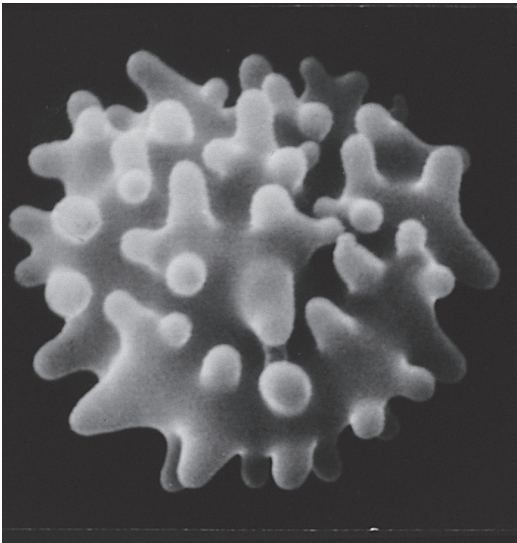


FIGURA 3.37 Micrografia eletrônica de um equinócito. Cortesia do Professor Aron Polliack, de Hoffbrand e Pettit [8].

TABELA 3.5 Algumas causas de equinocitose

Artefato de estocagem
Hepatopatia, particularmente com insuficiência renal coexistente
Carência nutricional (ou outra) de fosfato [71]
Deficiência de piruvatoquinase
Deficiência de fosfogliceratoquinase
Deficiência de aldolase [81]
Fase de descompressão do mergulho [82]
Síndrome hemolítico-urêmica
Após queimaduras
Após <i>bypass</i> cardiopulmonar
Hemangioma esplênico [83]
Pós-transfusional (esferoequinócitos)

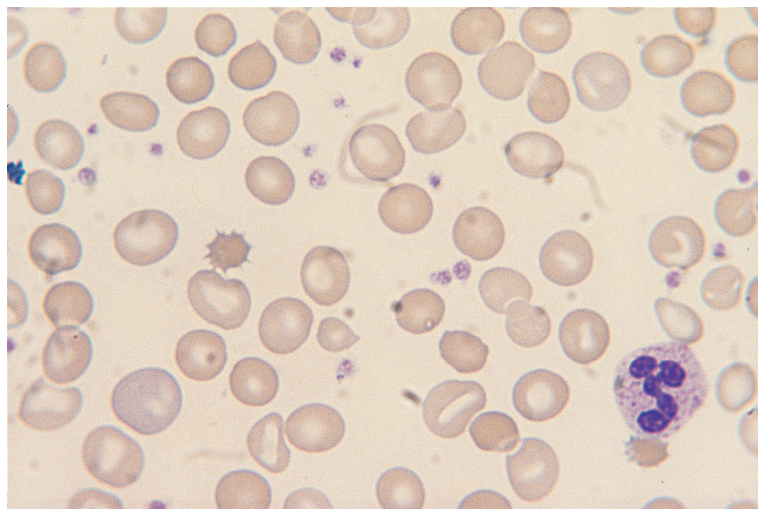


FIGURA 3.38 Esferoequinócito no sangue obtido logo após uma transfusão. O esferoequinócito é uma célula transfundida. Nota-se também policromatofilia.

alimentados parenteralmente pode ser atribuída a uma queda na concentração do ATP; também pode ser este o mecanismo responsável pela equinocitose na deficiência hereditária de piruvatoquinase e de fosfogliceratoquinase. Atribui-se a equinocitose que ocorre nos pacientes heparinizados, hipotérmicos e em *bypass* cardiopulmonar ao aumento na concentração de ácidos graxos livres. A equinocitose observada como resposta tardia em pacientes com queimaduras graves pode ser o resultado de alterações lipídicas.

Acantócitos

São eritrócitos de formato aproximadamente esférico, com 2 a 20 espículas de comprimentos diferentes, distribuídas de modo irregular sobre a superfície

(Figuras 3.39 a 3.46). Algumas das espículas não são pontiagudas, apresentando ponta em formato de baqueta de tambor. Causas de acantocitose são listadas na Tabela 3.6. A formação de acantócitos resulta, provavelmente, da expansão preferencial do folheto externo da dupla camada lipídica que constitui a membrana do eritrócito [99]. Acantócitos não formam *rouleaux*.

Ao contrário da equinocitose, a acantocitose não é revertida ao suspenderem-se os eritrócitos em plasma fresco. Na acantocitose associada à abetalipoproteinemia ou a hepatopatia, à relação colesterol/fosfolípido dos eritrócitos está aumentada. Em contrapartida, nos eritrócitos em alvo (*target cells*) associados à hepatopatia, as concentrações de colesterol e fosfolípidos aumentam paralelamente.

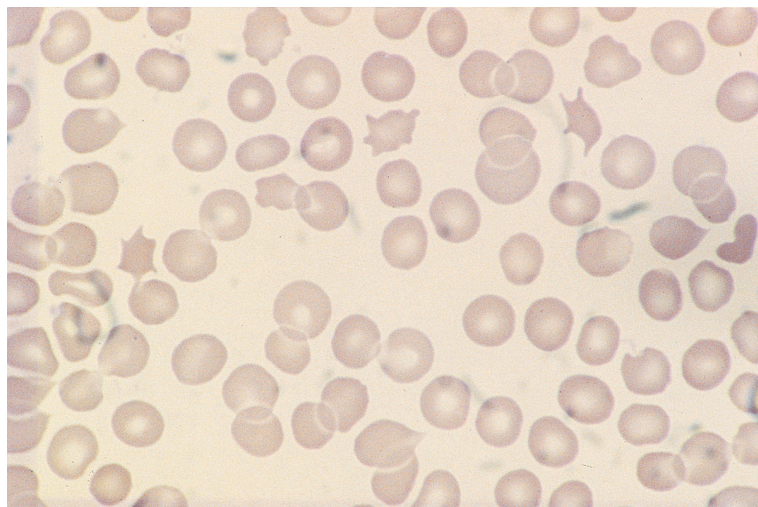


FIGURA 3.39 Acantócitos em paciente com anorexia nervosa.

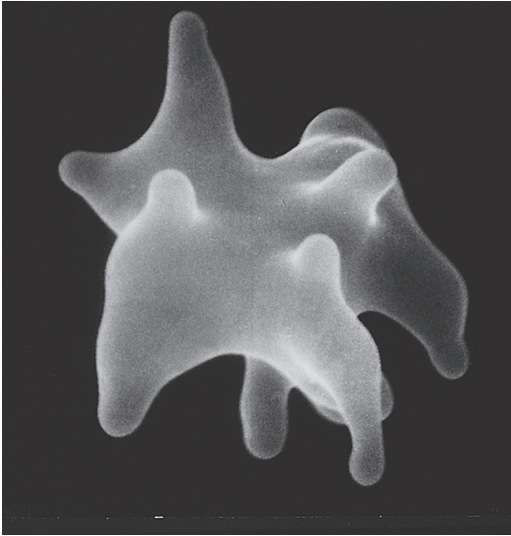


FIGURA 3.40 Micrografia eletrônica de varredura de um acantócito. Cortesia do Professor Aron Polliack, de Hoffbrand e Pettit [8].

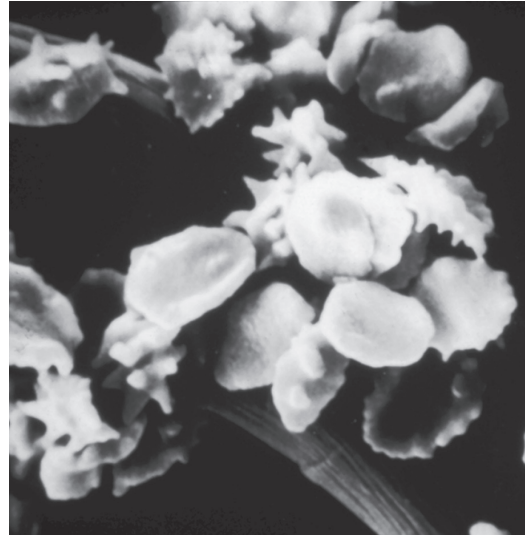


FIGURA 3.42 Micrografia eletrônica de varredura mostrando acantócitos em paciente com o fenótipo McLeod. Cortesia do Dr. Guy Lucas, Manchester.

A acantocitose como um fenômeno hereditário faz parte de várias síndromes, e sua presença ajuda a estabelecer o diagnóstico. A acantocitose foi descrita pela primeira vez em associação com retinite pigmentosa, doença neurológica degenerativa, má absorção de gorduras e abetalipoproteinemia [100]; a acantocitose pode também ser notada em hipobetalipoproteinemia hereditária. Pequena porcentagem de acantócitos é vista na doença de

Anderson e nas síndromes hereditárias de má absorção [98].

Mais tarde, foi reconhecida em associação com várias doenças neurológicas degenerativas raras, com β -lipoproteínas normais [101, 102]. Essas condições foram designadas neuroacantocitoses [88] (Figura 3.41). Acantócitos podem ser mais fáceis de identificar em preparações a fresco [103]. A maioria dos casos de neuroacantocitose decorre

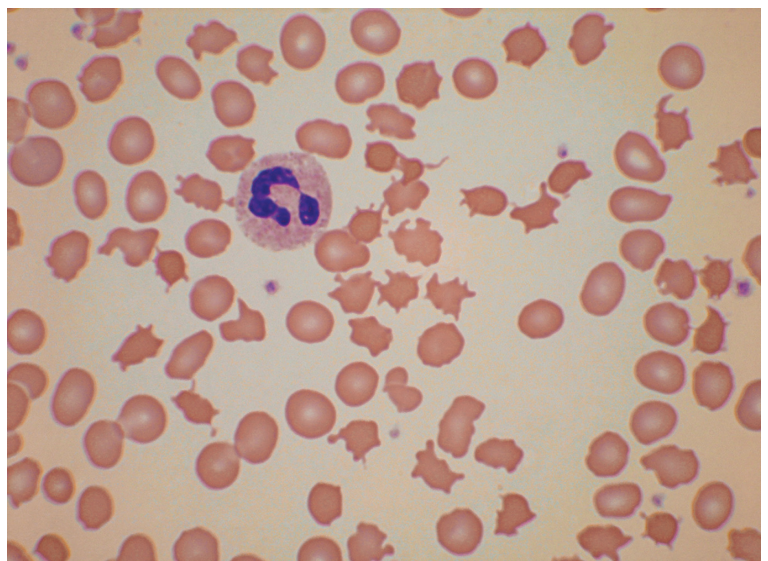


FIGURA 3.41 Distensão sanguínea mostrando acantócitos em caso de coreoacantocitose. Cortesia do Dr. Peter Bain, Londres.

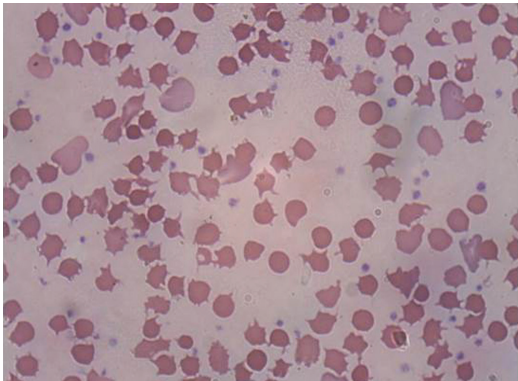


FIGURA 3.43 Campo em pequeno aumento de distensão sanguínea mostrando acantocitose resultante de homozigose para a mutação A858D no gene *SLC4A1*. Cortesia da Dra. Lesley Bruce, Bristol.

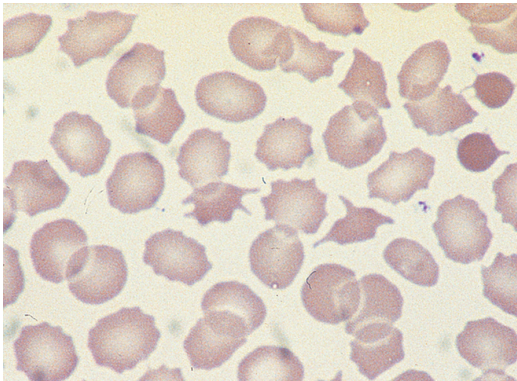


FIGURA 3.44 Número excepcionalmente elevado de acantócitos no sangue de um indivíduo hematologicamente normal submetido à esplenectomia. Há uma célula em alvo (*target cell*) no limite esquerdo da figura.

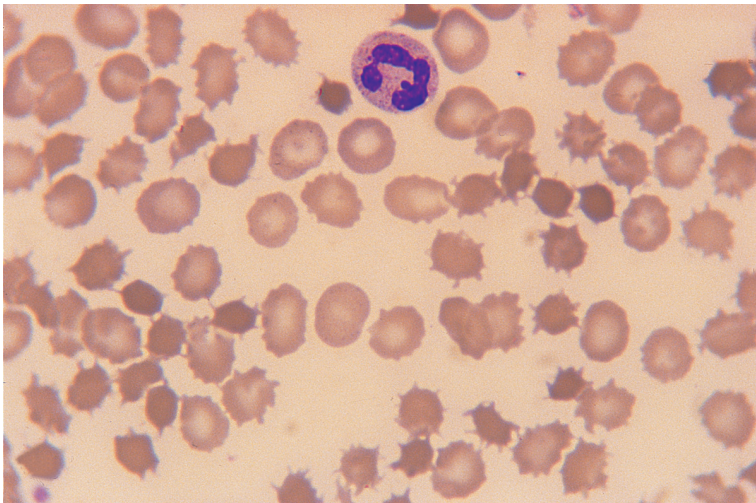


FIGURA 3.45 Numerosos acantócitos em paciente com abetalipoproteinemia.

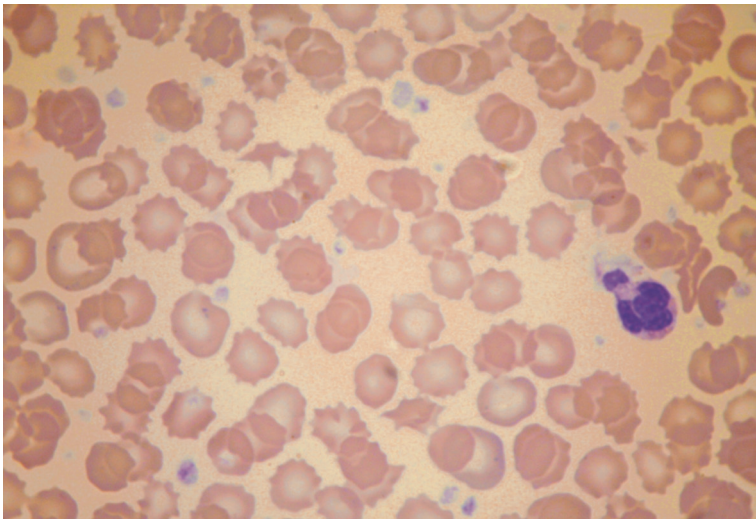


FIGURA 3.46 Numerosos acantócitos no sangue de bebê com pichnocyte infantil.

TABELA 3.6 Algumas causas de acantocitose

Condições associadas a um grande número de acantócitos
<i>Hereditárias</i>
Abetalipoproteinemia hereditária (mutação <i>MTP</i> , AR)
Hipobetalipoproteinemia hereditária (alguns casos; mutação <i>APOB</i> , AR)
Associada à doença neurológica degenerativa (neuroacantocitose), com lipoproteínas normais
Coreoacantocitose (mutação <i>VPS13A</i>), AR [88]
Fenótipo eritrocitário McLeod (mutação <i>KX</i> , recessiva ligada ao sexo)
Doença semelhante à de Huntington 2* (mutação <i>JPH3</i> , AD)
Neurodegeneração associada a pantotenatoquinase, síndrome HARP (hipoprebetalipoproteinemia, acantocitose, retinite pigmentosa e degeneração palidal)* (mutação <i>PANK2</i> , AR) [89]
Fenótipo eritrocitário In(Lu) (fenótipo Lu(a-b-), haploinsuficiência <i>KLF1</i> , [90])
Associada à anormalidade da banda 3 da membrana eritrocitária (mutação no gene <i>SLC4A1</i> , AR) [91-93]
Deficiência da cadeia mediana da acil-CoA desidrogenase (mutação <i>ACADM</i> , AR) [94]
Anemia hemolítica por excesso genético de fosfatidilcolina na membrana eritrocitária [95] (que provavelmente representa xerocitose hereditária)
<i>Adquiridas</i>
Hipobetalipoproteinemia causada por desnutrição ou privação de lipídios
Anemia hemolítica de “células em espora” (<i>spur cell anemia</i>) associada à hepatopatia (geralmente cirrose alcoólica, mas, ocasionalmente, hepatite viral grave, hepatite neonatal, cirrose cardíaca, hemocromatose ou doença de Wilson avançada)
Picnócitose infantil
Deficiência de vitamina E em recém-nascidos prematuros
Síndromes mielodisplásicas [96]
Condições associadas a um pequeno número de acantócitos
<i>Hereditárias</i>
Heterozigotos para o fenótipo McLeod
Deficiência de piruvatoquinase
Traço de Woronet
Diseritropoese associada com uma mutação <i>GATA1</i> [97]
Doença de Anderson (mutação <i>SARIB</i> , AR) [98]
<i>Adquiridas</i>
Pós-esplenectomia e hipoesplenismo
Anorexia nervosa e inanição
Mixedema e pan-hipopituitarismo

*Alguns casos têm acantócitos.

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva.

de mutações no gene *VPS13A* [104] e outras de mutação em *JP3* (juntofilina 3), *KX* (fenótipo McLeod) ou *PANK2* [88, 89, 105]. Em alguns casos do fenótipo McLeod (Figura 3.42), não há falta apenas de antígenos Kell, mas também ocorre doença

granulomatosa crônica como resultado de uma síndrome do gene contíguo; portadoras femininas da mutação têm dupla população de eritrócitos, uma acantocítica, outra não. O fenótipo In(Lu), no qual há supressão de Lu e de vários outros sistemas de antígenos de grupos sanguíneos [106], resulta de haploinsuficiência de um gene de fator de transcrição. Acantocitose também pode estar associada com deficiência da proteína banda 3 codificada por *SLC4A1*, resultante da homozigose para uma mutação P868L [91] ou A858D [92, 93] (Figura 3.43). Árabes omani homozigotos para a mutação A858D têm acantocitose chamativa e equinocitose, com ocasionais ovalocitócitos; heterozigotos têm um número menor de acantócitos (15-20%) com tendência mínima a ovalocitose [92]; indianos homozigotos para a mutação A858D foram descritos como apresentando esferocitose hereditária, mas as fotografias publicadas indicam que o aspecto predominante é o de acantocitose [93].

Queratócitos

Queratócitos (ou células com cornos) (Figura 3.47) são eritrócitos com pares de espículas, em geral duas, mas às vezes quatro ou seis, formados pela fusão de membranas contrapostas, originando um pseudovacúolo, com posterior ruptura na superfície celular. São formados quando há dano traumático aos eritrócitos, por exemplo, pelo choque com filamentos de fibrina ou com uma prótese cardíaca defeituosa. São vistos nas anemias hemolíticas esquizocíticas (com fragmentação eritrocítica), como as anemias hemolíticas microangiopáticas, na coagulação intravascular disseminada e nas nefropatias, como glomerulonefrite, uremia e no período pós-transplante. Também podem resultar da remoção de um corpo de Heinz (Figura 3.48) [107].

Prequeratócitos são eritrócitos que mantêm a palidez central e têm um vacúolo bem-definido abaixo da membrana; crê-se que darão origem a um queratócito ao romper-se o vacúolo. São muito característicos da deficiência de ferro, mas estão presentes também na β -talassemia menor, na anemia das doenças crônicas e nas anemias hemolíticas microangiopáticas [108].

Esquizócitos

Esquizócitos são fragmentos de eritrócitos. No sangue de adultos normais, não excedem 0,2% dos eritrócitos, mas nos recém-nascidos podem chegar a 1,9% e em prematuros a até 5,5% [109].

Esquizócitos formam-se por fragmentação de células anormais, por exemplo, na piropecilocitose

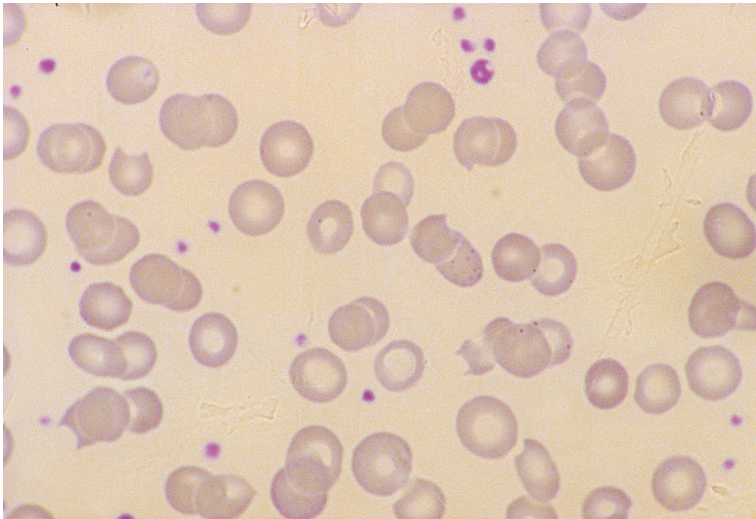


FIGURA 3.47 Queratócitos no sangue periférico de um paciente com anemia hemolítica microangiopática.



FIGURA 3.48 Fotografia com microscópio eletrônico de varredura de um queratócito formado pela retirada de um corpo de Heinz. Cortesia do Dr. M. Amare e colaboradores e do *British Journal of Haematology* [107].

hereditária, ou por lesão mecânica, tóxica ou induzida pelo calor de células previamente normais (Figura 3.49). Quando resultam de dano mecânico, esquizócitos geralmente coexistem com queratócitos. Muitos esquizócitos são espiculados; outros, que ficaram com uma porção muito pequena de membrana para seu volume citoplasmático, transformam-se em microesferócitos (esferoesquizócitos). Em pacientes queimados, os esquizócitos podem ser microdiscócitos ou microesferócitos (ver Figura 3.92). Uma forma incomum de fragmento de eritrócito, uma estrutura linear ou filamentosa,

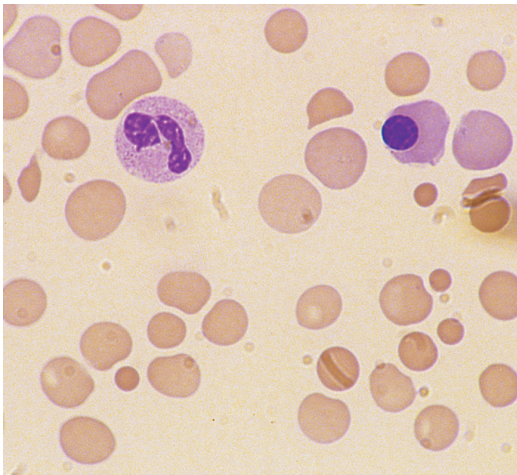


FIGURA 3.49 Fragmentos, incluindo microesferócitos, no sangue periférico de um paciente com síndrome hemolítico-urêmica. A distensão também mostra policromatofilia e um eritrócito nucleado.

pode ser observada na anemia de células falciformes [110] (Figura 3.50). As causas mais comuns de formação de esquizócitos são as anemias hemolíticas microangiopática e mecânica, ditas em conjunto anemias hemolíticas esquizocíticas. Esquizócitos podem ser um aspecto das SMDs [111] e são comuns em pacientes com eritroleucemia [80].

Diretrizes do International Council for Standardization in Haematology (ICSH) fornecem critérios para o reconhecimento e a contagem de esquizócitos nas anemias hemolíticas esquizocíticas [109]. Para esse fim, recomendam a inclusão de

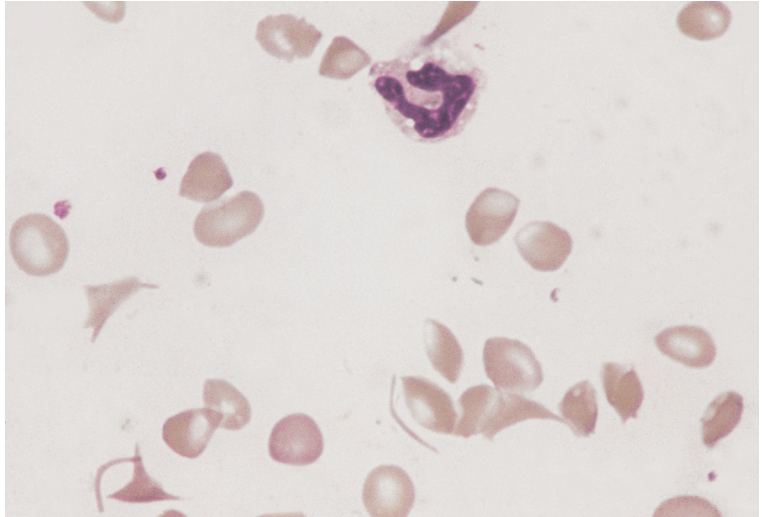


FIGURA 3.50 Distensão sanguínea de paciente com anemia de células falciformes, mostrando fragmentos lineares de eritrócitos e eritrócitos irregularmente contraídos; o último aspecto resulta de grave crise pulmonar de afoçamento na ocasião em que o sangue foi examinado.

fragmentos com ângulos agudos e bordos retos, pequenos crescentes, células em elmo (*helmet cells*), queratócitos e microesferócitos, estes apenas quando estão presentes alguns dos aspectos anteriores [109]. A contagem deve ser relativa a 1.000 eritrócitos, considerando-se significativa a presença de mais de 1% de esquizócitos. A contagem só é considerada relevante quando a esquizocitose é a anormalidade morfológica predominante.

Fragmentos de eritrócitos também podem ser contados por vários contadores automatizados, por exemplo, o Sysmex XE-2100 e o Bayer Advia 120. Os resultados podem ser usados para triagem de anemia hemolítica esquizocítica, mas resultados falso-negativos podem ser obtidos quando há macrocitose [109].

Eritrócitos em alvo (*target cells*)

Eritrócitos em alvo têm uma área de coloração mais densa no meio da área de palidez central (Figura 3.51). Formam-se como consequência de um excesso de membrana, que se torna redundante em relação ao volume do citoplasma; são mais delgados (leptócitos) do que os eritrócitos normais. *In vivo*, têm formato de sino, o que pode ser demonstrado à microscopia eletrônica de varredura (Figura 3.52). Quando distendidos na lâmina, achatam-se, formando a célula característica vista à microscopia óptica. Eritrócitos em alvo podem ser microcíticos, normocíticos ou macrocíticos, dependendo da anormalidade subjacente e do mecanismo de formação. Algumas das causas da formação de eritrócitos em alvo são apresentadas na Tabela 3.7.

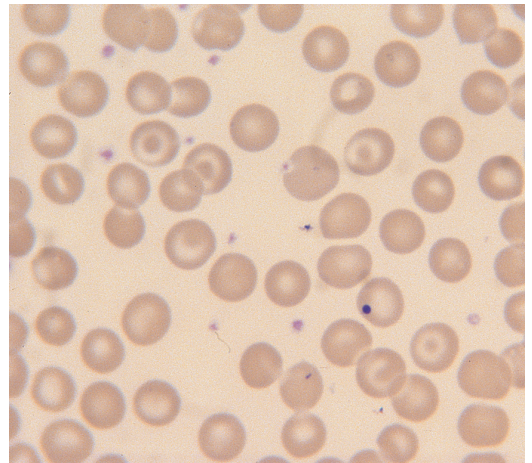


FIGURA 3.51 Distensão sanguínea de paciente hematologicamente normal que foi esplenectomizado, mostrando eritrócitos em alvo e um corpo de Howell-Jolly.

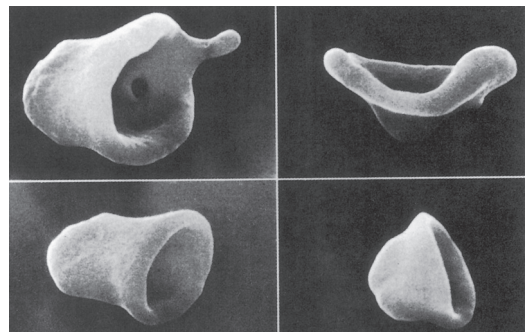


FIGURA 3.52 Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos em alvo. De Bessis [64].

TABELA 3.7 Algumas causas de formação de eritrócitos em alvo

Condições frequentemente associadas a grande número de eritrócitos em alvo
Icterícia obstrutiva
Deficiência hereditária de lecitina-colesterol aciltransferase
Hipobetalipoproteinemia familiar [112]
Hemoglobinopatia C
Anemia de células falciformes (hemoglobinopatia S/S)
Hemoglobinopatia S/C
Hemoglobinopatia D
Hemoglobinopatia O-Arab
Condições frequentemente associadas a número moderado ou pequeno de eritrócitos em alvo
Doença parenquimatosa hepática
Esplenectomia e outras situações hipoesplênicas
Traço da hemoglobinopatia C
Traço da hemoglobinopatia S
Traço ou hemoglobinopatia E
Traço da hemoglobina Lepore
β-Talassemia menor, intermédia e maior
Hemoglobinopatia H
Deficiência de ferro
Anemia sideroblástica
Xerocitose hereditária (variante da estomatocitose hereditária, com eritrócitos desidratados) [113]
Analfalipoproteinemia [114] e hipoalfalipoproteinemia [115]
Fitosterolemia hereditária [116]
Fitosterolemia adquirida como consequência de nutrição parenteral [116]

Eles podem ser artefatuais, decorrentes do uso de lâminas sujas [117].

Eritrócitos em alvo podem formar-se em consequência de excesso de membrana por aumento do conteúdo de lipídios. Esse é o mecanismo da formação na icterícia obstrutiva, na doença parenquimatosa hepática grave e na deficiência hereditária de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). A relação colesterol/ésteres de colesterol na membrana está aumentada. Os eritrócitos não possuem enzimas para a síntese do colesterol e dos fosfolipídios, nem para a esterificação do colesterol, de modo que as alterações nos lipídios da membrana são passivas, refletindo alterações dos lipídios plasmáticos. Quando a atividade da LCAT está reduzida, aumenta a relação colesterol/ésteres de colesterol na membrana do eritrócito. Pode ocorrer também aumento do colesterol total da membrana, acompanhado de aumento proporcional da lecitina e de diminuição da etanolamina. Como a LCAT é sintetizada nos

hepatócitos, pode estar reduzida nas doenças hepáticas. Na icterícia obstrutiva, níveis muito elevados de sais biliares inibem a LCAT; contudo, este parece não ser o único mecanismo responsável pela formação de eritrócitos em alvo na icterícia obstrutiva, já que pacientes podem apresentar eritrócitos em alvo sem que seu plasma consiga inibir a atividade da LCAT do plasma normal. Quando se formam eritrócitos em alvo em consequência de alterações lipídicas do plasma, há reversão ao formato normal ao serem transfundidos em indivíduos com lipídios plasmáticos normais. Se as alterações da membrana lipídica que causam a formação de eritrócitos em alvo ocorrerem em pacientes com esferocitose, as células tornam-se mais disciformes; esse fenômeno pode ser observado quando um paciente com esferocitose hereditária desenvolve icterícia obstrutiva.

Um mecanismo alternativo de formação de eritrócitos em alvo é a redução do conteúdo citoplasmático sem uma redução proporcional da quantidade de membrana. Esse é o mecanismo da formação de eritrócitos em alvo em um grupo de condições, como a deficiência de ferro, as talassemias e as hemoglobinopatias, nas quais eritrócitos em alvo estão associados à hipocromia ou à microcitose. Eritrócitos em alvo são relativamente escassos na deficiência de ferro e numerosos nas talassemias; a razão dessa diferença não está clara.

Knizócitos (*dimple cells*)

Knizócitos são eritrócitos tricôncavos; podem ser vistos em pacientes com doença hepática [118].

Estomatócitos

Estomatócitos são eritrócitos que, na distensão corada, apresentam uma fenda linear, ou estoma, central (Figura 3.53); são vistos, ocasionalmente, em distensões de sangue normal. À microscopia eletrônica de varredura, ou em preparações a fresco, com as células suspensas no plasma, têm formato de xícara sem asa ou de tigela (Figura 3.54). Estomatócitos podem ser formados *in vitro*, por exemplo, em resposta a um baixo pH ou à exposição a fármacos lipossolúveis catiônicos, como a clorpromazina; a alteração no formato é reversível. O estágio final da transformação discócito ⇒ estomatócito é o esferoestomatócito. A estomatocitose resulta de uma variedade de anormalidades da membrana do eritrócito, mas é provável que o mecanismo essencial seja a expansão do folheto interno da dupla camada lipídica que a constitui [99]. A formação de estomatócitos na doença hepática tem sido atribuída



FIGURA 3.53 Estomatócitos em distensão de sangue na estomatocitose hereditária.

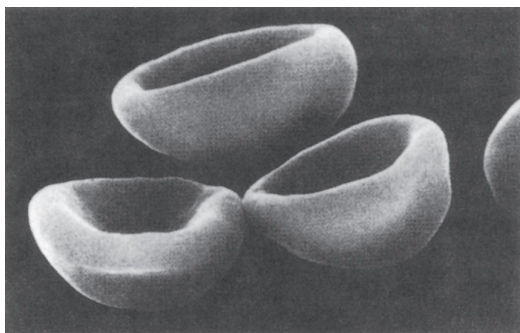


FIGURA 3.54 Micrografia eletrônica de varredura de estomatócitos. De Bessis [64].

ao aumento de lisolecitina na camada interna da membrana eritrocitária. Na esferocitose hereditária e na anemia hemolítica autoimune, a perda progressiva da membrana leva à formação de estomatócitos, esferoestomatócitos e esferócitos.

A presença de estomatócitos associa-se a uma grande variedade de condições clínicas [119, 120], mas nem sempre tem sido estabelecida uma conexão etiológica. A causa mais comum de estomatocitose é o excesso alcoólico e a hepatopatia alcoólica; nesses casos, macrocitose também é frequente, e, na doença hepática muito avançada, podem existir, ainda, células tricôncavas (knizócitos) [121]. A combinação de estomatocitose com macrocitose também é vista em pacientes que recebem hidroxycarbamida e, ocasionalmente, em SMDs. É possível que a exposição à clorpromazina cause estomatocitose *in vivo*, da mesma forma que

in vitro; já foi descrita uma correlação [120]. Certas anomalias hereditárias da membrana eritrocitária caracterizam-se pela presença de estomatócitos, isoladamente, como na estomatocitose hereditária e na xerocitose hereditária, ou em associação com outras anormalidades, como nas síndromes de Rh_{nulo} ou Rh_{MOD} [122] e na ovalocitose do Sudeste Asiático. Ovalócitos e estomatócitos ocorrem em homozigotos para mutações no gene SLC4A1, que causam acidose tubular distal renal (ver anteriormente). Na anemia hemolítica do excesso hereditário de fosfatidilcolina da membrana do eritrócito, há estomatocitose e células em alvo [95]; crê-se atualmente que essa condição seja idêntica à xerocitose hereditária [123]. Estomatocitose associa-se com alguns casos de anemia hemolítica hereditária decorrente de superprodução de adenosina desaminase [123]. A analfalipoproteinemia (doença de Tangier) [114] e a hipoalfalipoproteinemia [115] estão associadas à estomatocitose. Estomatócitos e células em alvo foram descritos em caso único de hipobetalipoproteinemia familiar [112], mas a microfotografia publicada só mostra aspectos convincentes de células em alvo. A deficiência da LCAT mostra tanto células em alvo quanto estomatócitos. Foi relatada, na Austrália [124], uma incidência aumentada de estomatocitose em indivíduos sadios de origem mediterrânea (gregos e italianos). Sabe-se atualmente que essa condição, denominada estomatocitose/macrotrombocitopenia mediterrânea, é uma manifestação de fitosterolemia hereditária [125]. Aspectos morfológicos similares, também associados a anemia hemolítica e trombocitopenia, ocorrem em associação com nutrição parenteral com emulsões de lipídios à base de soja [116].

Células falciformes (drepanócitos)

A célula falciforme é um tipo de célula muito específico, restrito à anemia de células falciformes (drepanocitose) e às outras formas de doença siclêmica. Tem formato de crescente ou foicinha (ou banana), com extremidades pontiagudas (Figura 3.55). O formato característico é muito nítido em fotografias com microscópio eletrônico de varredura (Figura 3.56). A distensão sanguínea na anemia de células falciformes também pode mostrar eritrócitos em formato de barco ou aveia (ver Figura 3.55), que não são patognomônicas da presença de hemoglobina S, mas são altamente sugestivas. Outros pecilócitos altamente característicos da presença de Hb S são os pecilócitos SC, formados quando estão presentes, ao mesmo tempo, Hb S e Hb C (Figura 3.57)

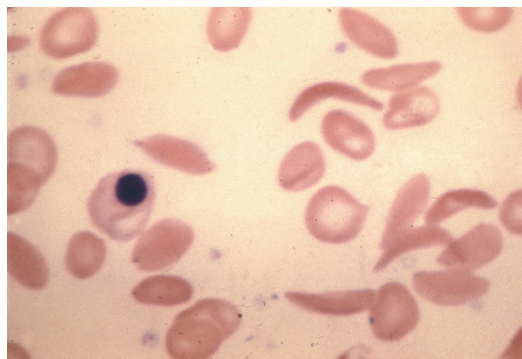


FIGURA 3.55 Distensão sanguínea mostrando células falciformes, células em barco e um eritroblasto.

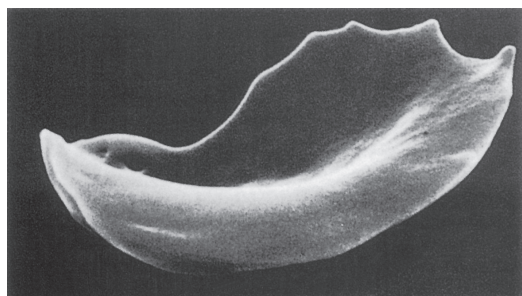


FIGURA 3.56 Fotografia com microscópio eletrônico de varredura de uma célula falciforme. De Bessis [64].

e células em “chapéu de Napoleão”, características da combinação hemoglobina S com hemoglobina S-Oman (Figura 3.58). Raramente, são observadas células falciformes em sangue de paciente com traço falciforme; há descrição recente da formação de células falciformes como artefato, em criança com leucemia linfoblástica aguda com alta contagem de blastos; isso foi atribuído ao consumo de oxigênio pelas células leucêmicas *in vitro* [126].

Eritrócitos pinçados

Eritrócitos pinçados ou em formato de cogumelo são uma característica dos esferócitos da esferocitose hereditária decorrente da deficiência de banda 3 (Figura 3.59). Também são comuns na eritroleucemia [65]. Células semelhantes podem ser vistas em hemólise induzida por drogas oxidantes, quando se formam pela remoção de dois corpos de Heinz adjacentes.

Inclusões nos eritrócitos

Corpos de Howell-Jolly

Corpos de Howell-Jolly (ver Figura 3.51) são inclusões eritrocitárias arredondadas, de tamanho médio,

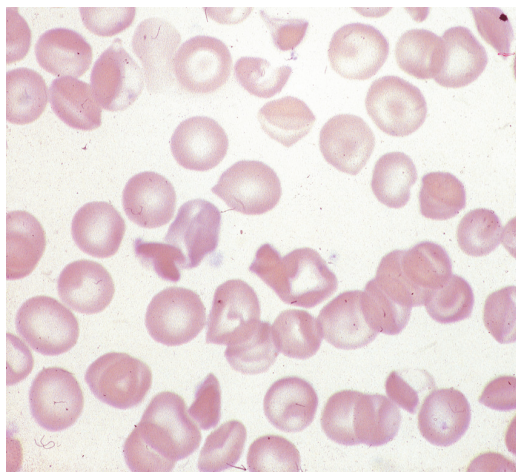


FIGURA 3.57 Distensão sanguínea de paciente com heterozigose composta para hemoglobinas S e C, mostrando um pecilócito SC característico.

compostas por DNA, com características tintoriais iguais às do núcleo. O corpo de Howell-Jolly é um fragmento de material nuclear; pode resultar de cariorrexe (fragmentação do núcleo) ou de expulsão nuclear incompleta, ou representar cromossomos que se separaram do fuso mitótico durante uma mitose anormal. Alguns corpos de Howell-Jolly são encontrados nos eritrócitos da medula óssea em indivíduos hematologicamente normais, mas, como são removidos pelo baço, não são vistos no sangue periférico. Aparecem no sangue após esplenectomia e nos estados hipoesplênicos, inclusive transientes, como em sobrecargas do sistema reticuloendotelial. Constituem um achado normal nos recém-nascidos, pois estes têm o baço funcionalmente imaturo. A formação de corpos de Howell-Jolly está aumentada nas anemias megaloblásticas, e, se o paciente também for hipoesplênico, serão vistos no sangue periférico em grande número. A procura de corpos de Howell-Jolly à microscopia convencional é um método eficaz para identificação de hipoesplenismo significativo; a contagem de *pitted cells** à microscopia de contraste de fase é mais sensível e identifica até hipofunções esplênicas moderadas.

*N. de T. A microscopia eletrônica evidencia claramente pequenas escavações crateriformes (*pits*) na superfície de raros eritrócitos; são menos evidentes, mas também notadas, com contraste de fase. Devem corresponder a pontos de onde foram removidas inclusões por ação esplênica.

FIGURA 3.58 Distensão sanguínea de paciente com heterozigose composta para hemoglobina S e hemoglobina S-Oman, mostrando células em “chapéu de Napoleão”, características da Hb S-Oman. Cortesia do Dr. R. A. Al Jahdamy e colaboradores, Oman.

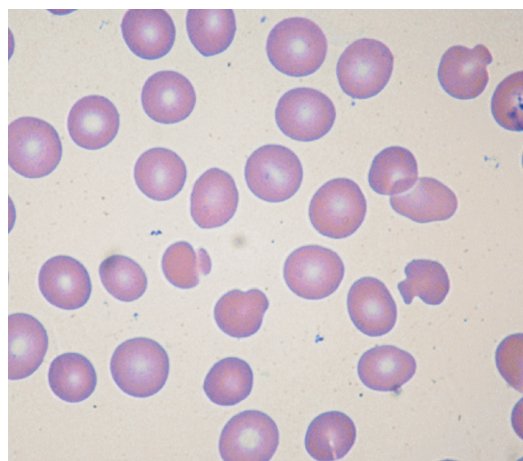
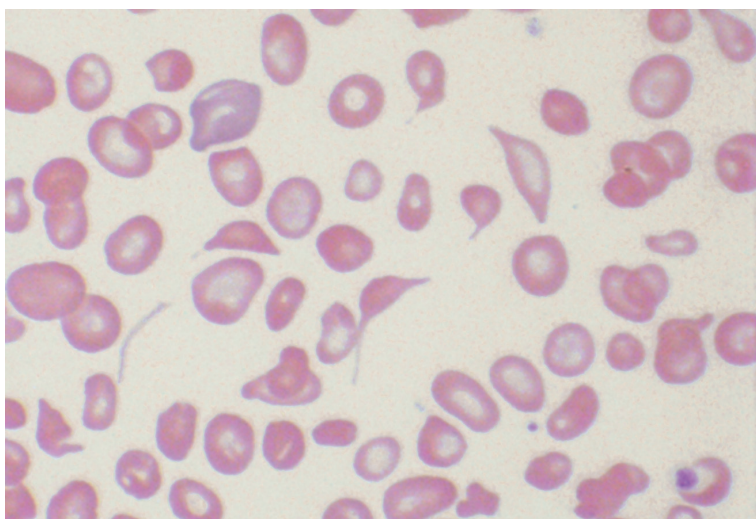


FIGURA 3.59 Sangue periférico de paciente com esferocitose hereditária resultante da mutação da banda 3, mostrando eritrócitos pinçados ou em cogumelo.

Pontilhado basófilo

A expressão “pontilhado basófilo” descreve a presença de considerável número de pequenas inclusões basófilas, contendo RNA, dispersas no citoplasma dos eritrócitos (Figura 3.60). São compostas por agregados de ribossomos; os agregados podem incluir mitocôndrias em degeneração e siderossomos, mas a maioria das inclusões desse tipo não se cora pela coloração do ferrocianeto ácido de Perls para o ferro.

Raros eritrócitos com pontilhado basófilo podem ser vistos, ocasionalmente, em sangue normal.

Estão presentes em número chamativo nas seguintes condições: talassemia menor, especialmente traços β -talassêmico e α -talassêmico (quando devida à hemoglobina Constant Spring), talassemia maior, anemias megaloblásticas, hemoglobinas instáveis, anemias hemolíticas, estados diseritropoéticos em geral (incluindo anemias diseritropoéticas congênitas, anemia sideroblástica, eritroleucemia e mielofibrose primária), hepatopatias e intoxicação por metais pesados, como chumbo, arsênico, bismuto, zinco, prata e mercúrio. O pontilhado basófilo é uma característica proeminente da deficiência hereditária de pirimidina 5'-nucleotidase [128], enzima necessária à degradação do RNA. A inibição dessa enzima pode também ser responsável pelo proeminente pontilhado basófilo observado em muitos pacientes intoxicados por chumbo. Achados similares foram descritos em caso atribuído a deficiência de CPD-colina fosfotransferase, resultando no acúmulo de pirimidina fosfodiéster, CPD-colina [129].

Corpúsculos de Pappenheimer

Corpúsculos de Pappenheimer (Figura 3.61; ver também Figura 3.20) são inclusões basófilas contendo ferro que podem estar presentes em pequeno número nos eritrócitos, geralmente formando pequenos conglomerados próximos à periferia da célula. São compostos por agregados de ferritina, ou de mitocôndrias ou fagossomos que contêm ferritina agregada. Coram-se pela coloração de Romanowsky, pois conglomerados de ribossomos coprecipitam com as organelas que contêm ferro. O eritrócito que contém

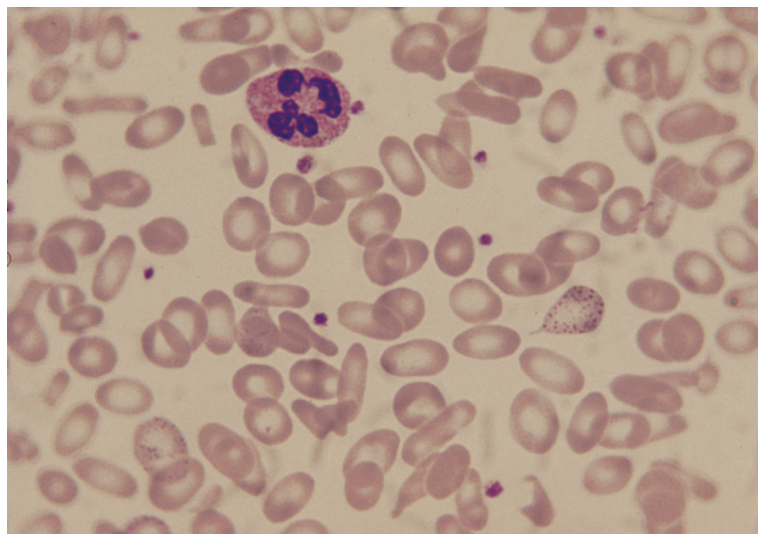


FIGURA 3.60 Nítido pontilhado basófilo na distensão de sangue de paciente com herança simultânea de traço β -talassêmico e eliptocitose. Há, também, microcitose e grande número de eliptócitos e ovalócitos. Uma das células intensamente pontilhadas é um pecilócito em formato de lágrima. Cortesia do Dr. F. Toolis, Dumfries.

corpúsculos de Pappenheimer é denominado siderócito; reticulócitos frequentemente contêm corpúsculos de Pappenheimer. Podem ser vistos, em pequeno número, em indivíduos hematologicamente normais esplenectomizados; nestes, são agregados de ferritina. Em condições patológicas, como a intoxicação por chumbo ou a anemia sideroblástica, os corpúsculos de Pappenheimer também podem representar mitocôndrias ou fagossomos carregados de ferro. Nesses pacientes, quando esplenectomizados, estão presentes em grande número.

Anéis de Cabot

Anéis de Cabot são remanescentes de microtúbulos que constituíram o fuso mitótico [130]. Podem tomar uma forma circular ou a figura de um oito (Figura 3.62).

Microrganismos nos eritrócitos

Tanto protozoários parasitos quanto outros microrganismos podem ser vistos dentro de eritrócitos (ver adiante).

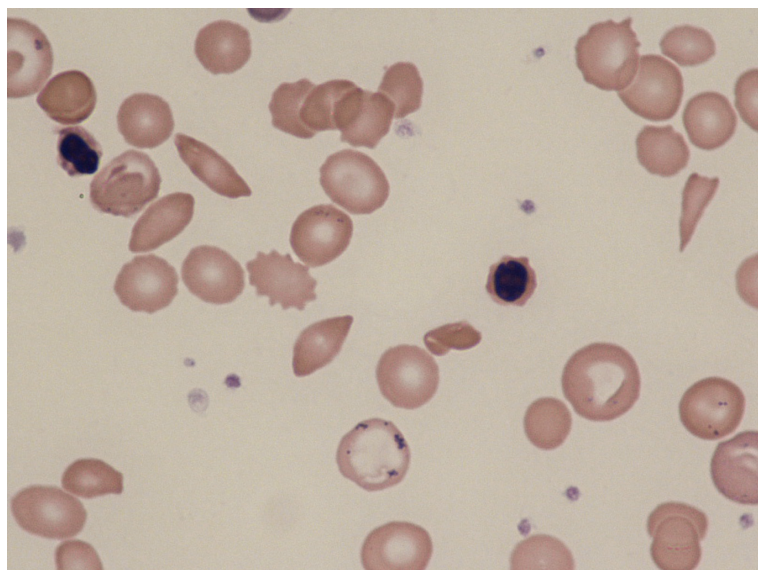


FIGURA 3.61 Distensão de sangue de paciente com anemia de células falciformes mostrando um eritrócito com múltiplos corpúsculos de Pappenheimer. O posicionamento periférico e a tendência à aglomeração são evidentes.

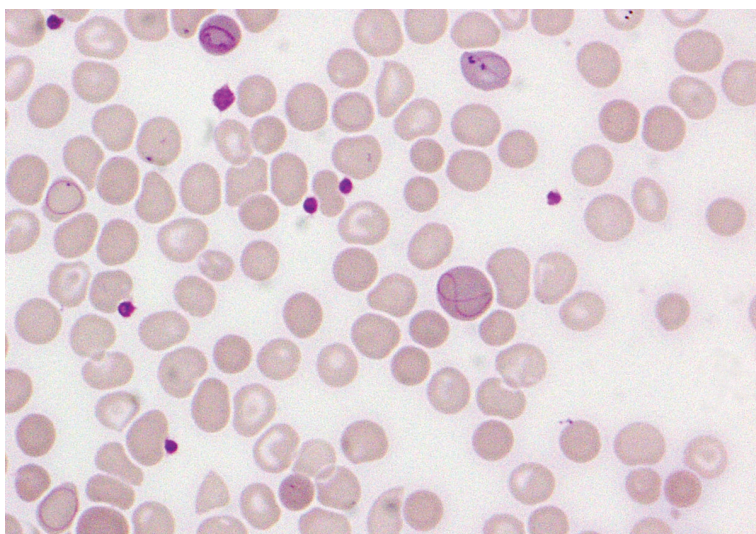


FIGURA 3.62 Anéis de Cabot no sangue de paciente que recebeu paclitaxel, um inibidor de microtúbulos; aumento médio. Cortesia do Dr. Greg Hapgood, Melbourne.

Cristais

Cristais finos, de cor violeta, geralmente em posição radial, foram descritos em pacientes com porfiria eritropoética congênita (Figura 3.63) [131].

Eritroblastos circulantes

Exceto no período neonatal, e raramente na gravidez, a presença de eritroblastos (NRBC = *nucleated red blood cells*) no sangue periférico (ver Figura 3.49) é anormal, geralmente indicando eritropoese hiperplásica ou infiltração da medula óssea. Há um aumento do número de eritroblastos no período neonatal de prematuros e quando há retardo do crescimento ou o neonato sofreu hipoxia. Uma contagem de eritroblastos aumentada ao nascimento, com novo aumento em vez da diminuição no

período neonatal, foi descrita como preditiva de hemorragia intraventricular em prematuros [132]. Em bebês com síndrome de Down, também há aumento do número de eritroblastos. Em análise multivariada, a presença de eritroblastos é preditiva de mortalidade em pacientes hospitalizados, exceto em pacientes obstétricas e pacientes com anemia de células falciformes [87]. A presença de eritroblastos também é preditiva de mortalidade em pacientes na unidade de tratamento intensivo [133].

Quando são vistos eritroblastos e também precursores granulocíticos, o aspecto é descrito como “leucoeritoblástico” ou “reação leucoeritoblástica”. Eritroblastos presentes no sangue periférico podem ser morfológicamente anormais, por exemplo, megaloblásticos, ou com características compatíveis com deficiência de ferro ou eritropoese sideroblástica. Nas intoxicações por arsênico e por chumbo [134], assim como em certos estados disritropoéticos, como a eritroleucemia, e mesmo na anemia ferropênica severa, os eritroblastos circulantes podem apresentar uma frequência aumentada de cariorrexe. O exame da camada de leucócitos (*buffy coat*) é útil quando se deseja avaliar alterações morfológicas dos eritroblastos no sangue periférico.

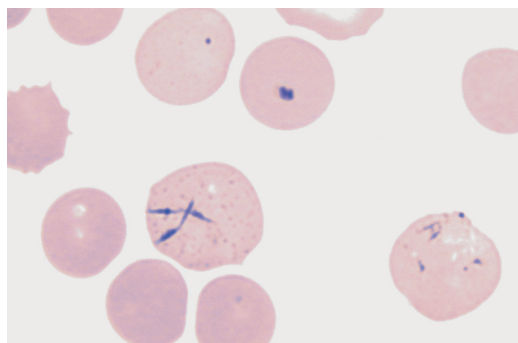


FIGURA 3.63 Sangue periférico de paciente com porfiria eritropoética congênita mostrando eritrócito com cristais dispostos radialmente. Cortesia da Dra. Anna Merino e colaboradores, Barcelona, e do *British Journal of Haematology* [131].

Aglutinação de eritrócitos, formação de *rouleaux* e de rosetas

Aglutinação de eritrócitos (ver Figura 3.14) é a formação de aglomerados irregulares de células, ao passo que *rouleaux* (Figura 3.64) é a formação de conglomerados de eritrócitos, que lembram moedas empilhadas.

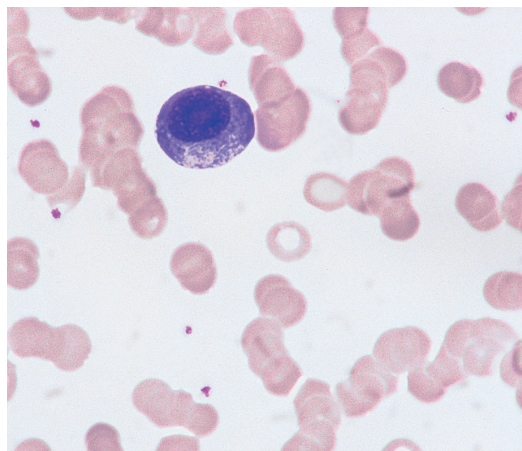


FIGURA 3.64 Distensão sanguínea de paciente com mieloma múltiplo mostrando exagero na formação de *rouleaux* pela presença de uma paraproteína; a distensão também mostra aumento da coloração de fundo e uma célula mielomatosa circulante.

Reticulócitos podem aglutinar-se quando estão em número excessivo, sendo este um fenômeno normal. Eritrócitos maduros aglutinam-se quando estão revestidos por anticorpos. Na anemia hemolítica autoimune com anticorpos quentes, podem ser vistos pequenos aglutinados de eritrócitos. Aglutinados são mais comuns na hemoglobinúria paroxística noturna, e na doença crônica de crioaglutininas pode haver aglutinação intensa a ponto de ser macroscopicamente visível (ver Figura 3.2).

Há exagero na formação de *rouleaux* quando aumenta a concentração plasmática de proteínas de alto peso molecular. As causas mais comuns são gravidez

(na qual aumenta o fibrinogênio), condições inflamatórias (nas quais há aumento policlonal de imunoglobulinas, de α_2 -macroglobulina e de fibrinogênio) e neoplasias de células plasmáticas, como o mieloma múltiplo (pela presença de uma paraproteína monoclonal). A formação de *rouleaux* pode aumentar artefactualmente quando a gota de sangue permanece muito tempo na lâmina antes de ser distendida.

A aglomeração anormal dos eritrócitos também pode ocorrer em pacientes que recebem medicamentos intravenosos veiculados em óleos de rícino polietoxilados como miconazol, fitomenadiona e ciclosporina.

A disposição de eritrócitos formando rosetas em torno de neutrófilos (Figura 3.65) é um fenômeno raro, provavelmente de mecanismo imunológico. Às vezes, é um fenômeno *in vitro* que pode ser EDTA-dependente [135]. Tem sido descrito junto com eritrofagocitose na hemoglobinúria paroxística noturna [136].

Leucócitos

Os leucócitos do sangue periférico normal são classificados como polimorfonucleares e mononucleares; o último termo inclui linfócitos e monócitos. Os leucócitos polimorfonucleares são também denominados granulócitos polimorfonucleares ou apenas granulócitos. O termo “granulócito” é usado para indicar tanto os leucócitos polimorfonucleares maduros vistos no sangue periférico quanto seus precursores granulados. Os granulócitos possuem núcleos lobulados de formato variável, isto é, polimórficos, e

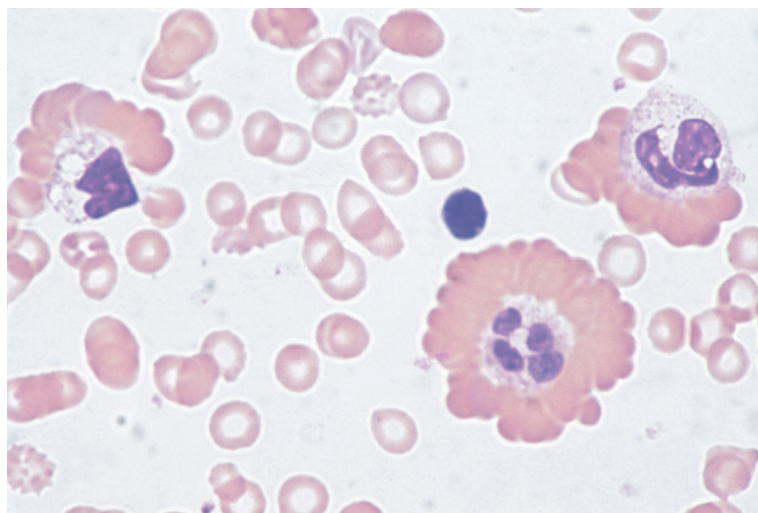


FIGURA 3.65 Eritrócitos formando rosetas.

grânulos citoplasmáticos proeminentes, cujas características tintoriais diferem conforme a classe à qual pertencem – neutrófilos, eosinófilos ou basófilos. As células mononucleares também têm grânulos; no caso dos monócitos, são quase imperceptíveis, ao passo que nos linfócitos são algumas vezes proeminentes, mas escassos. Em condições patológicas, assim como em certas condições fisiológicas, como a gravidez e durante o período neonatal, precursores dos polimorfonucleares podem aparecer no sangue periférico. Vários tipos de leucócitos anormais também podem ser vistos no sangue em doenças hematológicas e não hematológicas. Os termos “polimorfonucleares” e “granulócitos” não devem ser usados para referência específica a neutrófilos, já que também incluem eosinófilos e basófilos.

Granulócitos

O neutrófilo

O neutrófilo maduro mede 12-15 μm de diâmetro. O citoplasma é acidófilo, com muitos grânulos delicados. Os grânulos visíveis não são os grânulos secundários do neutrófilo: estes estão abaixo do limite de resolução do microscópio óptico. Na verdade, são os mesmos grânulos primários com suas características cromáticas modificadas. Embora não sejam individualmente visíveis, são os grânulos específicos que dão a cor rósea característica do citoplasma dos neutrófilos. O núcleo tem a cromatina em grumos, sendo dividido em 2 a 5 lóbulos distintos, ligados por estreitos filamentos de heterocromatina densa, cercados por membrana nuclear (Figura 3.66).

O núcleo tende a adotar uma disposição aproximadamente circular, pois, na célula viva, os lóbulos nucleares estão dispostos em círculo ao redor do centrossomo. Nas mulheres, pode-se ver o *drumstick*, um apêndice em formato de baqueta de tambor ou de gota, projetando-se do núcleo de uma pequena porcentagem de células (Figura 3.67). Os grânulos dispersam-se de maneira uniforme pelo citoplasma, mas pode haver uma porção de citoplasma agranular, proeminente na margem da célula, provavelmente a borda que avança com a célula em movimento ativo.

Características do núcleo

O neutrófilo bastonado e o desvio à esquerda

Uma célula idêntica ao neutrófilo maduro, mas desprovida de lóbulos nucleares (Figura 3.68) é denominada “neutrófilo bastonado”, ou núcleo em bastão (em inglês, “*stab*” form, do alemão *Stabzelle*, referindo-se ao formato do cajado dos pastores). O Committee for the Clarification of Nomenclature of Cells and Diseases of the Blood and Blood Forming Organs (Comitê para Padronização da Nomenclatura das Células e Doenças dos Órgãos Hematopoéticos) definiu como bastonado “qualquer célula da série granulocítica cujo núcleo pode ser descrito como uma faixa curva ou espiralada, não importando o grau de indentação, desde que esta não segmente completamente o núcleo em lóbulos unidos por um filamento”. O filamento é uma conexão semelhante a um fio “sem material nuclear significativo” [137]. O bastonado diferencia-se do metamielócito (ver a seguir) por apresentar uma porção apreciável de núcleo com margens paralelas. Nos indivíduos saudáveis, é

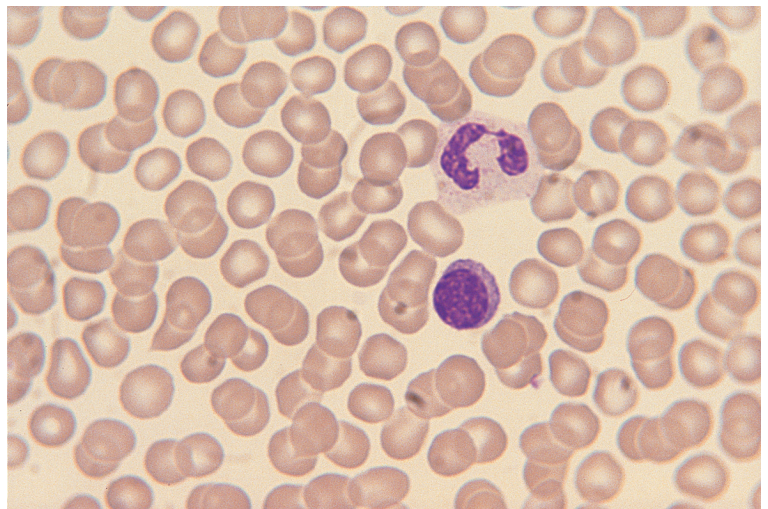


FIGURA 3.66 Distensão de sangue normal mostrando um neutrófilo polimorfonuclear e um linfócito pequeno. A disposição em círculo dos lóbulos nucleares é evidente.

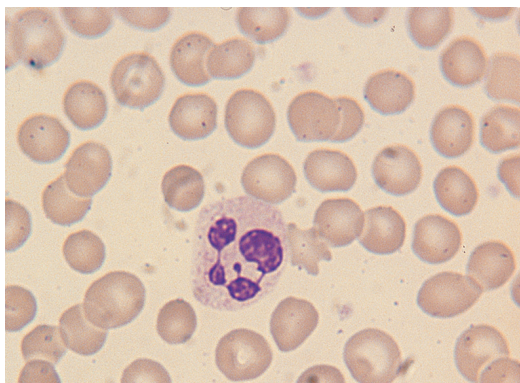


FIGURA 3.67 Distensão sanguínea de mulher sadia mostrando um neutrófilo normal com *drumstick*.

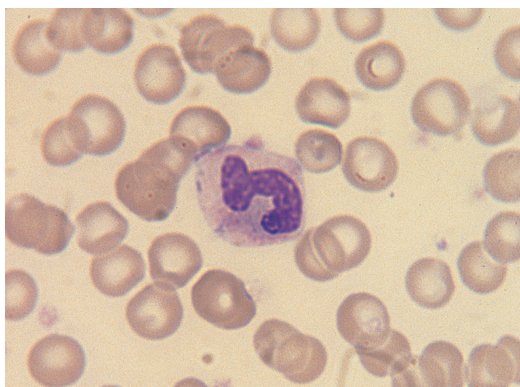


FIGURA 3.68 Neutrófilo bastonado. O núcleo não é segmentado e a cromatina é menos condensada do que a da maioria dos neutrófilos segmentados.

pequeno o número de bastonados no sangue; o aumento do número de neutrófilos bastonados em relação aos neutrófilos segmentados é designado “desvio à esquerda”. Quando ocorre desvio à esquerda, também podem ser liberados no sangue precursores mais imaturos dos neutrófilos (metamielócitos, mielócitos, promielócitos, e até blastos). O desvio à esquerda é uma ocorrência fisiológica na gravidez; quando não está associado à gravidez, comumente indica resposta a infecção, inflamação ou a outra forma de estímulo à medula óssea. Um desvio à esquerda, incluindo até mesmo algumas células blásticas, é induzido pela administração de citocinas, como o fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) e o fator estimulante de colônias granulocítica e macrófaga (GM-CSF).

Os valores de referência para a porcentagem ou o número absoluto de bastonados, ou para a razão dos bastonados para os segmentados, dependem da definição exata de bastonado utilizada, e de como

essa definição é aplicada na prática. É comum a discordância entre laboratórios quanto à definição, assim como a variação entre e dentro dos laboratórios quanto ao modo de aplicá-la.

A contagem de bastonados tem sido empregada na detecção de infecção neonatal, mas, novamente, não há concordância nas definições [138, 139]. Por exemplo, Akenzua e colaboradores [138] definiram o neutrófilo segmentado como célula com lóbulos unidos por um filamento, cuja largura equivale a menos de um terço do diâmetro máximo dos lóbulos, ao passo que Christensen e colaboradores [140] exigiram que os lóbulos fossem unidos por um filamento nuclear claramente definido. Um aumento de neutrófilos bastonados em recém-nascido pode ser devido a infecção bacteriana (p. ex., estreptococo do grupo B ou listeria) ou infecção viral congênita (p. ex., citomegalovírus ou vírus coxsackie). Um desvio à esquerda contribui para o escore de Alvarado para o diagnóstico presuntivo de apendicite aguda [141].

A contagem de lóbulos dos neutrófilos e o desvio à direita

No sangue normal, a maioria dos neutrófilos tem de 1 a 5 lóbulos. Neutrófilos com 6 lóbulos são raros. Diz-se que há desvio à direita quando a contagem lobular média está aumentada ou quando há uma porcentagem elevada de neutrófilos com 5 ou 6 lóbulos. A contagem lobular média dos neutrófilos normais é discordante entre os observadores, tendo sido obtidos, em diferentes trabalhos, valores de 2,5 a 3,3 [142]. Na prática, a contagem formal dos lóbulos é demasiadamente demorada e tediosa, e a presença de mais de 3% de neutrófilos com 5 ou mais lóbulos (Figura 3.69) é um indicador mais prático de desvio à direita.* Esse é, também, um índice mais sensível de hipersegmentação dos neutrófilos do que a contagem lobular média, permitindo que a hipersegmentação seja detectada em pacientes nos quais um aumento simultâneo dos bastonados causaria normalização da contagem lobular média. Outro índice de desvio à direita, ainda mais sensível do que os anteriores, é o índice de segmentação:*

$$\frac{\text{Número de neutrófilos com 5 lóbulos ou mais} \times 100}{\text{Número de neutrófilos com 4 lóbulos}}$$

Valores acima de 16,9 são anormais [143]. Um desvio à direita, ou hipersegmentação, é visto na anemia megaloblástica, ocasionalmente em pacientes com infecção, uremia e SMDs. Há significativa

*N. de T. Todas as contagens de lóbulos e índices decorrentes são inviáveis na rotina laboratorial no Brasil.

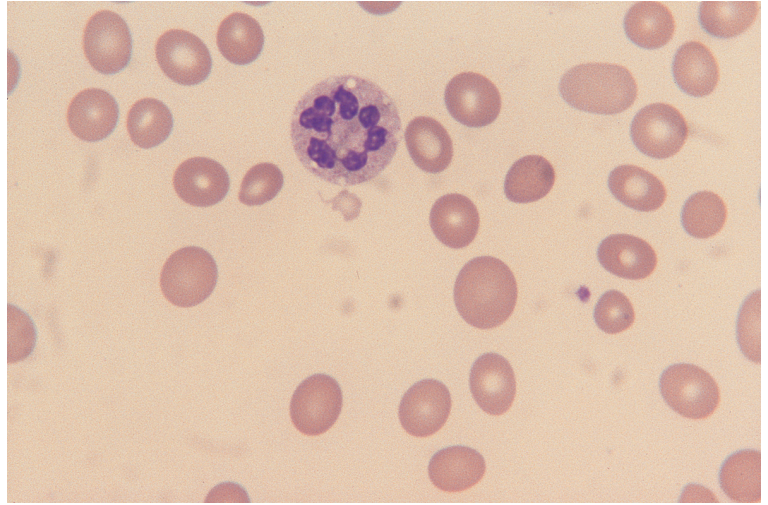


FIGURA 3.69 Neutrófilo hipersegmentado, com 7 lóbulos nucleares. Há também anisocitose, com micrócitos e macrócitos.

incidência na anemia ferropênica, mesmo quando outras deficiências hematínicas são excluídas [144]. Alguns neutrófilos hipersegmentados são vistos após injeção de G-CSF [145]. Neutrófilos hipersegmentados, também designados *pleocariócitos*, são células diploides; na anemia megaloblástica, **não** são derivados de metamielócitos gigantes [146]. Hipersegmentação dos neutrófilos ocorre como característica hereditária rara, herdada de forma autossômica dominante [147]. Na raríssima condição hereditária conhecida como mielocatexa [148, 149], há neutropenia, associada a um defeito genético na lobulação dos neutrófilos. Os neutrófilos são hipersegmentados, com longos filamentos de cromatina entre os lóbulos e com cromatina grosseira, quase picnótica; também podem ser vistos corpos de Döhle, granulação

tóxica e vacuolização [149]. Neutrófilos semelhantes são vistos, raramente, nas SMDs (Figura 3.70); diferem, no entanto, dos neutrófilos da condição hereditária, porque costumam ser tetraploides (*macropolícitos*). A presença de macropolícitos com mais de 5 lóbulos nucleares não é indicativa de desvio à direita, pois o número aumentado de lóbulos deve-se a um aumento do conteúdo de DNA pela poliploidia, não a um defeito de segmentação.

O “*drumstick*”, os nódulos sésseis e outras projeções nucleares

Nas mulheres normais, alguns neutrófilos apresentam um apêndice nuclear em formato de baqueta de tambor, com cerca de 1,5 μm de diâmetro, o qual se liga ao resto do núcleo por um

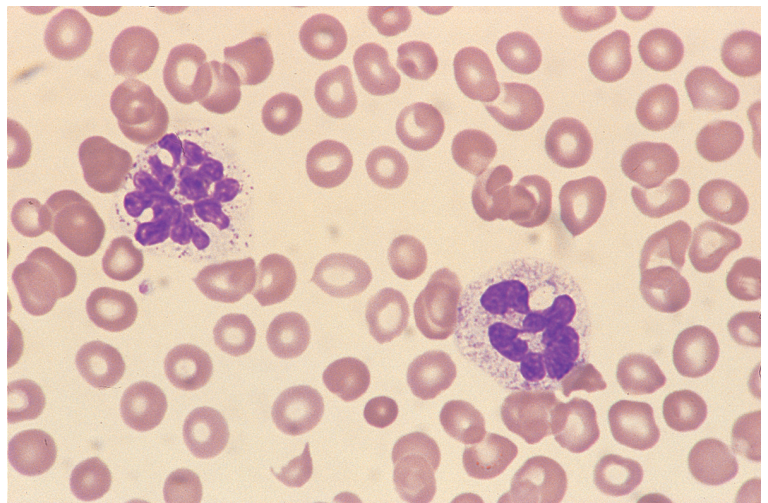


FIGURA 3.70 Distensão de sangue de paciente com síndrome mielodisplásica mostrando dois neutrófilos. Ambos são macropolícitos (neutrófilos tetraploides), o que se nota pelo tamanho e pela quantidade de material nuclear; o neutrófilo da esquerda mostra um defeito da segmentação nuclear que lembra a mielocatexa.

filamento [150] (ver Figura 3.67). Os *drumsticks* representam o cromossomo X inativo da mulher. Projeções semelhantes com palidez central (formas em raquete) não são *drumsticks*, e não têm o mesmo significado destes. Nas células sem *drumstick*, o cromossomo X inativo está condensado abaixo da membrana nuclear, onde pode ser notado em alguns neutrófilos bastonados [151], ou projeta-se do núcleo como um nódulo sésseil (Figura 3.71). Da mesma forma que os *drumsticks*, os nódulos sésseis em geral são encontrados somente em mulheres. Em um trabalho, a frequência dos *drumsticks* foi estimada de 1 em cada 38 a 1 em cada 200 neutrófilos, e esta é uma característica individual, mas também proporcional à contagem lobular [150, 152]. Quando ocorre desvio à esquerda, a proporção de células com *drumstick* diminui, ao passo que nos macropolíctos e quando há desvio à direita resultante de anemia megaloblástica ou hipersegmentação hereditária dos neutrófilos, a frequência dos *drumsticks* aumenta.

A presença e a frequência dos *drumsticks* estão relacionadas ao número de cromossomos X. Eles não ocorrem nos homens normais, nos indivíduos com síndrome de feminilização testicular, com fenótipo feminino, mas sexo genético masculino (XY), e tampouco nas pacientes com síndrome de Turner (XO). Nos indivíduos do sexo masculino com síndrome de Klinefelter (XXY), são vistos *drumsticks*, mas seu número é inferior ao das mulheres. Paradoxalmente, é raro mulheres XXX apresentarem células com *drumsticks* duplos; a contagem

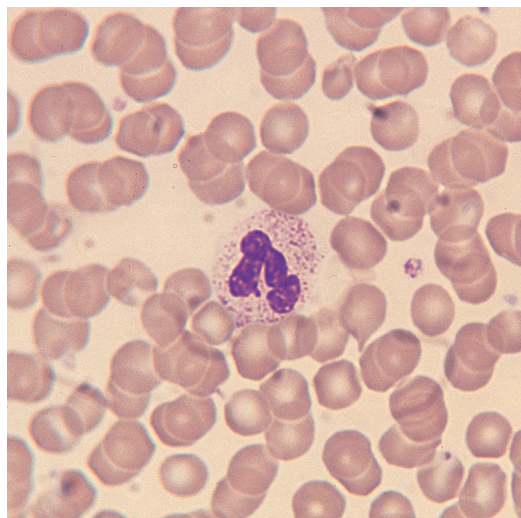


FIGURA 3.71 Distensão sanguínea de mulher normal mostrando um neutrófilo bastonado com um nódulo sésseil.

lobular e a frequência de *drumsticks* são mais baixas do que nas mulheres normais; há uma incidência aumentada de nódulos sésseis, tendo-se sugerido que a presença de um cromossomo X extra inibia a segmentação nuclear [153]. Triploidia com cariótipo 69,XXY, entretanto, associa-se com a presença de *drumsticks* e de núcleos grandes, com excesso de nódulos sésseis e projeções em formato de espinhos e de bastões [154]. Mulheres com isocromossomo do braço longo do cromossomo X têm *drumsticks* maiores e mais frequentes, ao passo que mulheres com deleções do cromossomo X têm *drumsticks* menores [147]. Nas quimeras humanas naturais, que apresentam uma mistura de células de origem feminina e masculina, a frequência dos *drumsticks* é compatível com a mistura de neutrófilos masculinos/femininos [152]; de maneira análoga, pode ser vista uma alteração da contagem de *drumsticks* após transplante de medula óssea quando a medula óssea de uma mulher for transplantada para um homem ou vice-versa.

A proporção de neutrófilos com *drumsticks* e nódulos sésseis diminui em mulheres com leucemia mieloide crônica, mas volta ao normal quando a contagem de leucócitos baixa com o tratamento [155]. Na síndrome de Down, tanto a contagem de *drumsticks* quanto a contagem lobular média são baixas [156].

Além dos *drumsticks* e dos nódulos sésseis, os núcleos dos neutrófilos podem apresentar outras projeções, com formato de clavas, ganchos ou etiquetas. Essas projeções também podem ser vistas nos neutrófilos de homens. Um número aumentado de projeções nucleares pode ser um aspecto das SMDs [157] (Figura 3.72). Várias projeções, em pequenos filamentos, do núcleo da maioria dos neutrófilos constituem uma característica da síndrome congênita trissomia 13 [158, 159].

Outras anormalidades nucleares dos neutrófilos

Outras anormalidades do núcleo dos neutrófilos estão listadas na Tabela 3.8. A segmentação nuclear reduzida, quando não decorre de estímulo temporário à medula óssea com a liberação de bastonados, existe como anomalia hereditária (anomalia de Pelger-Huët) ou como um defeito adquirido (pseudoanomalia de Pelger-Huët). A anomalia de Pelger-Huët foi descrita pela primeira vez por Pelger, em 1928, e sua natureza familiar foi reconhecida por Huët, em 1931 [178]; é herdada como uma característica autossômica dominante, cuja prevalência varia em diferentes

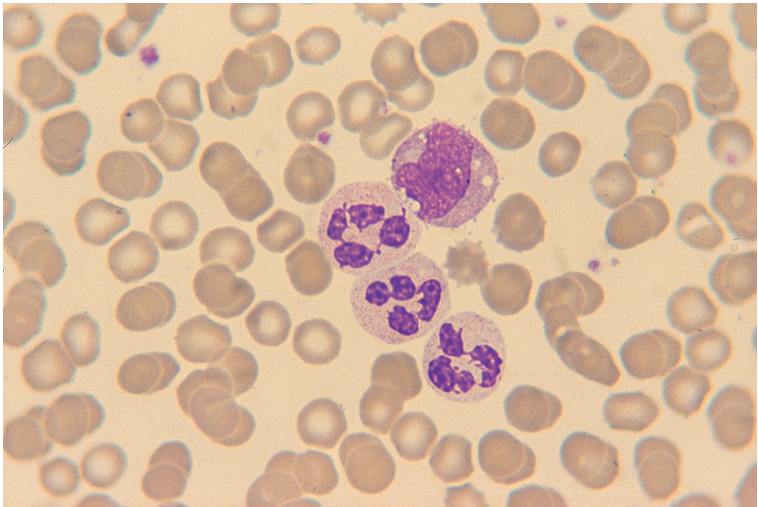


FIGURA 3.72 Sangue periférico de um paciente com leucemia mielomonocítica crônica mostrando neutrófilos com projeções nucleares anormais.

TABELA 3.8 Algumas alterações e anomalias que podem estar presentes no núcleo dos neutrófilos

Anormalidade	Presença notada em
Desvio à esquerda	Gravidez, infecção, hipoxia, choque
Hipersegmentação	Eritropoese megaloblástica Deficiência de ferro Uremia Infecção Hipersegmentação hereditária dos neutrófilos Mielocatexe [148] Síndromes mielodisplásicas [160]
Hiposegmentação	Anomalia de Pelger-Huët Deficiência de grânulos específicos [161] Neutropenia congênita severa devida à mutação <i>VPS45</i> [162] Neutrófilos não lobulados com outras anomalias congênicas (um caso) [163] Anomalia de Pelger-Huët adquirida (pseudo-Pelger) nas síndromes mielodisplásicas e leucemia mieloide aguda Anomalia de Pelger-Huët reversível induzida por fármacos (micofenolato de mofetila, tacrolimos) [164]
Aumento de projeções nucleares	Síndrome de trissomia 13 [158] Associada a plaquetas grandes (só uma família) [165] Associada a um cromossomo Y grande (semelhante a um <i>drumstick</i>) [166] Síndrome de Turner [167] Como defeito isolado [168] Síndromes mielodisplásicas [157]
Núcleo em anel	Leucemia mieloide crônica [169] Leucemia mieloide aguda [170] Leucemia neutrofílica crônica [171] Anemia megaloblástica [172]
Núcleo botrioide	Intermação [173] Hipertermia [174] Queimaduras
Condensação excessiva da cromatina	Síndromes mielodisplásicas [175] Efeito reversível de certos fármacos (incluindo micofenolato de mofetila) Mielocatexe [149]
Fragmentos destacados do núcleo	Granulocitopoese displásica decorrente de infecção por HIV [176] ou de administração de fármacos que interferem na síntese de DNA [177], incluindo clorambucil, micofenolato de mofetila e tacrolimos

comunidades de 1 caso para 100 a 1 caso para 10 mil indivíduos [179]. Está descrita em muitos grupos étnicos, incluindo brancos, negros, chineses, japoneses e indonésios; resulta de uma mutação no gene *LBR*, em 1q42.1, que codifica o receptor lamin B [180]. O defeito é chamativo: a maioria dos neutrófilos apresenta núcleo bastonado ou bilobulado (Figura 3.73a), estes com lóbulos mais arredondados do que o normal e cromatina mais condensada; é característico um formato de óculos ou pincenê. Outros núcleos têm formato de halteres ou amendoins (Figura 3.73b). Uma pequena porcentagem de neutrófilos, em geral não superior a 4%, possui núcleos nem bastonados nem lobulados (Figura 3.73c); eles se diferenciam dos mielócitos por apresentarem menor relação núcleo-citoplasmática, cromatina nuclear mais condensada e citoplasma mais maduro. Pessoas com a anomalia de Pelger-Huët também mostram lobulação reduzida dos eosinófilos e basófilos [181]. Nos raros homozigotos com a anomalia de Pelger-Huët, todos os neutrófilos têm núcleos ovais ou redondos. Os núcleos dos neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos não são lobulados; pode haver leve neutropenia, plaquetas gigantes e leve trombocitopenia [182]. Homozigotos também, podem, apresentar retardo de desenvolvimento, epilepsia e anormalidades esqueléticas [180], mas a maioria não apresenta. A distinção entre a anomalia de Pelger-Huët e o desvio à esquerda é importante, uma vez que a condição heterozigótica herdada é desprovida de significado clínico. Quando há desvio à esquerda, em paciente com a anomalia de Pelger-Huët, a porcentagem de neutrófilos bastonados aumenta ainda mais. Se um indivíduo com a anomalia de Pelger-Huët desenvolver eritropoese megaloblástica, há desvio à direita, e são vistos neutrófilos com 3, 4, ou até 5 lóbulos [183]; a megaloblastose também provoca a perda dos grumos densos da cromatina nuclear, e os *drumsticks* tornam-se identificáveis.

Em outra anomalia congênita, designada deficiência dos grânulos específicos (antes designada deficiência de lactoferrina), neutrófilos com acentuada redução do número de grânulos específicos mostram também núcleos bilobulados [161, 184] (Figura 3.74). Foi descrito um único caso de paciente com associação de neutrófilos não lobulados, malformações esqueléticas, microftalmia e retardo mental [163].

A anomalia de Pelger-Huët adquirida (Figura 3.75) é comum nas SMDs e nas leucemias mieloides agudas (LMAs). É vista, ocasionalmente,

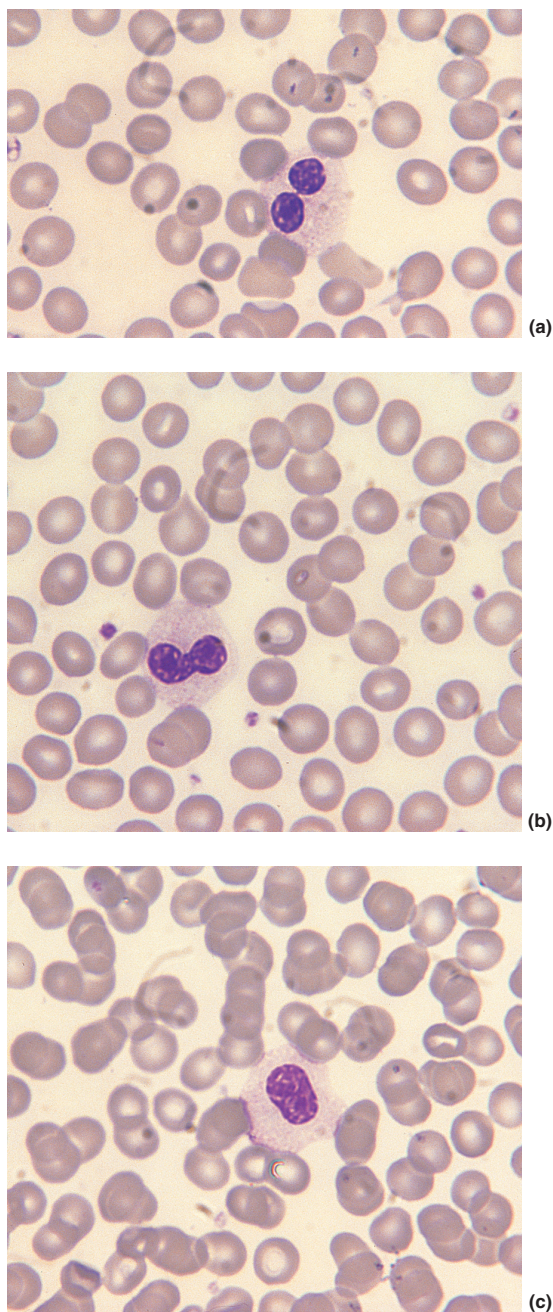


FIGURA 3.73 Sangue periférico de um paciente com a anomalia de Pelger-Huët hereditária mostrando três neutrófilos com (a) núcleo bilobulado, (b) núcleo em formato de amendoim e (c) núcleo não lobulado.

em outras neoplasias hematológicas, em particular na mielofibrose primária, e durante a evolução da leucemia mieloide crônica (LMC). As características que ajudam a distingui-la da anomalia herdada são a porcentagem geralmente menor de

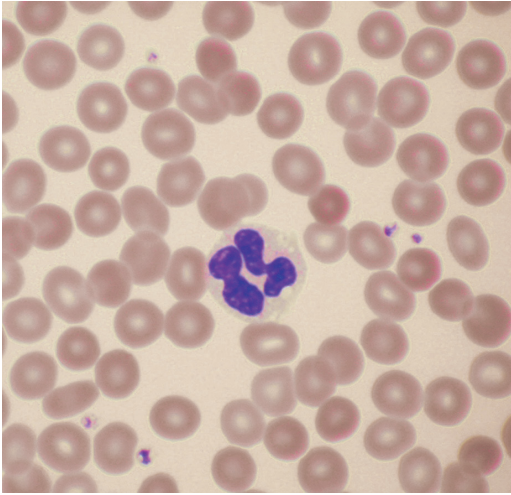


FIGURA 3.74 Distensão de sangue de paciente com deficiência dos grânulos específicos mostrando um neutrófilo agranular com lobulação nuclear reduzida. Cortesia do Dr. Mike Leach.

neutrófilos pelgeroides e a constante associação com neutropenia, hipogranularidade dos neutrófilos, corpos de Döhle ou características displásicas em outras linhagens.

A redução da lobulação dos neutrófilos é rara em outras circunstâncias, mas já foi descrita em associação com o uso de colchicina, ibuprofeno [185], paclitaxel [186], docetaxel [186], micofenolato de mofetila [187] (Figura 3.76), tacrolimos, valproato de sódio [187] e outros fármacos, bem como na mononucleose infecciosa, na malária, no mixedema, no

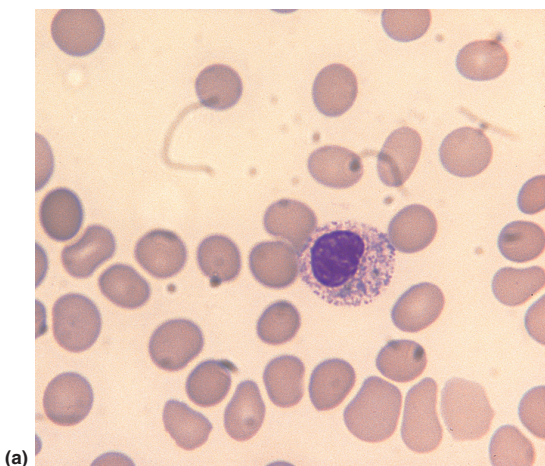
carcinoma metastático da medula óssea, na leucemia linfocítica crônica (LLC) e na enterite aguda [147].

Neutrófilos com núcleo em formato de anel ou rosquinha (Figura 3.77) são vistos ocasionalmente em indivíduos normais. Sua frequência está aumentada na LMC, na leucemia neutrofílica crônica e possivelmente nas SMDs [169]; às vezes, são numerosos na LMA [170].

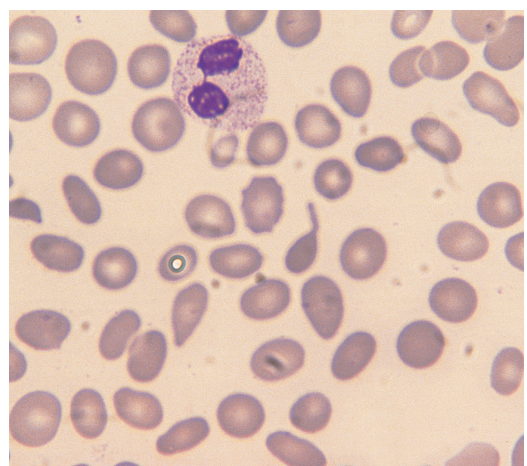
Outro defeito adquirido do núcleo dos neutrófilos é a segmentação radial, conformando-se um núcleo “botrioide”, isto é, cujo formato lembra um cacho de uvas. A alteração resulta da contração dos microfilamentos que se irradiam a partir do centríolo. A alteração botrioide foi descrita em queimaduras (Figura 3.78), em intermação [173] e na hipertermia decorrente de hemorragia no tronco cerebral [174], de abuso de cocaína (Figura 3.79) ou de metanfetamina [188].

Nas SMDs, na LMA e na anomalia de Pelger-Huët reversível, causada por drogas, às vezes observa-se uma aglomeração excessiva da cromatina nuclear dos neutrófilos.

Raramente, se notam fragmentos nucleares destacados (Figura 3.80) nos neutrófilos, equivalentes aos corpos de Howell-Jolly dos eritrócitos; a natureza dos fragmentos pode ser confirmada pela coloração de Feulgen para DNA. Tais inclusões são indicativas de disgranulocitopoese e foram descritas pela primeira vez em pacientes recebendo azatioprina [177]. São vistas ocasionalmente em pacientes sob quimioterapia antitumoral, em associação com alterações pelgeroides reversíveis, causadas pelas drogas. Esses fragmentos nucleares não



(a)



(b)

FIGURA 3.75 Distensão sanguínea de paciente com anomalia de Pelger-Huët adquirida vista em síndrome mielodisplásica relacionada à terapia mostrando: (a) um neutrófilo com núcleo não lobulado e (b) anisocitose, picilicose e um neutrófilo com núcleo bilobulado.

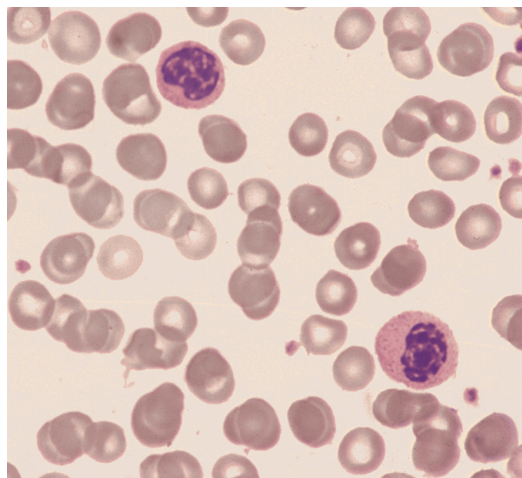


FIGURA 3.76 Sangue periférico de paciente com mielo-displasia reversível causada por micofenolato de mofetila. Ambos os neutrófilos têm núcleo redondo, não segmentado, com cromatina grosseiramente condensada; um tem alta relação núcleo-citoplasmática.

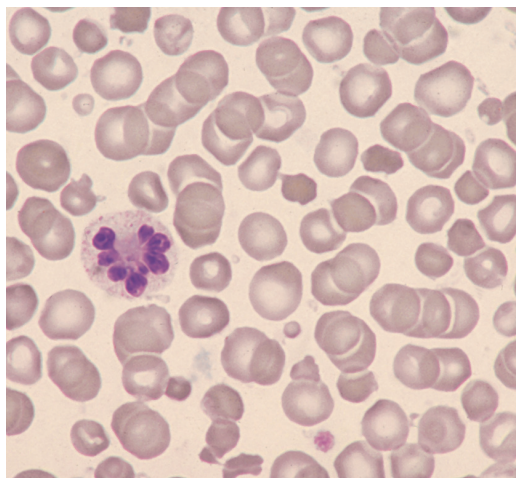


FIGURA 3.78 Distensão sanguínea de paciente com queimaduras extensas, mostrando um neutrófilo com núcleo botrioide e um corpo de Döhle.

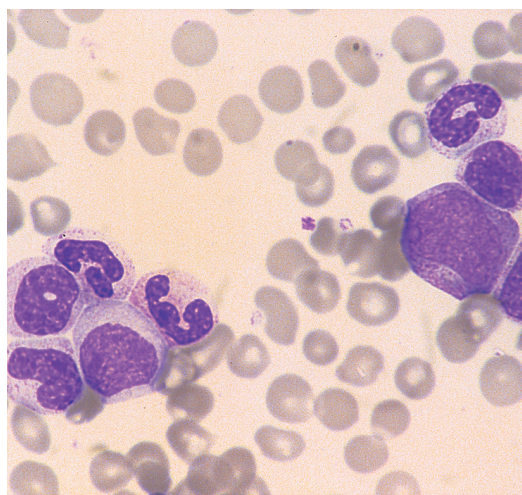


FIGURA 3.77 Distensão sanguínea de paciente com LMC mostrando neutrófilos e precursores de neutrófilos. Há um neutrófilo com núcleo em formato de anel.

são raros em pacientes HIV-positivos [176], mesmo na ausência de qualquer tratamento medicamentoso.

A administração de G-CSF e de GM-CSF pode causar o aparecimento de neutrófilos com núcleos hipersegmentados, hipossegmentados e com núcleo em anel [189].

Toxicidade por colchicina causa vacuolização anormal e cariorrexe dos neutrófilos [190].

Neutrófilos eventualmente mostram aspectos de apoptose: o núcleo torna-se homogêneo, com condensação periférica da cromatina ou, alternativamente, fragmenta-se em massas redondas homogêneas. É uma anormalidade inespecífica, que pode ser vista em condições infecciosas, inflamatórias e autoimunes, ou durante quimioterapia citotóxica [191]. A apoptose deve ser distinguida das alterações degenerativas artefatuais, morfologicamente semelhantes, que ocorrem *in vitro* pela conservação prolongada do sangue.

Anormalidades do citoplasma do neutrófilo

As anormalidades do citoplasma do neutrófilo estão resumidas na Tabela 3.9.

Granulação reduzida

A granulação reduzida dos neutrófilos ocorre como uma anomalia congênita muito rara, a deficiência de grânulos específicos (ver Figura 3.74). É mais frequente como anormalidade adquirida, na maioria das vezes um aspecto das SMDs (Figura 3.81). Na infecção pelo HIV, alguns dos neutrófilos podem mostrar hipogranulação, mas não tão nítida quanto nas SMDs. Em infecções graves, podem ser notados neutrófilos com granulação reduzida, pela descarga de grânulos; os grânulos remanescentes podem ser proeminentes. Neutrófilos produzidos em resposta à administração de G-CSF podem ser hipogranulares [145]. Infusão intravenosa

FIGURA 3.79 Imagem composta (4 campos) de distensão sanguínea de paciente com hipertermia induzida por cocaína, mostrando núcleos botrioides. Agradecimentos ao Dr. Patrick Ward, Duluth, Minnesota.

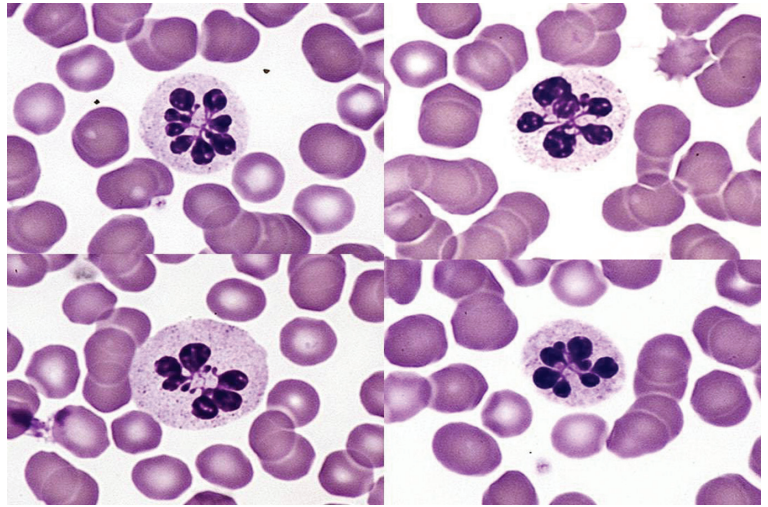
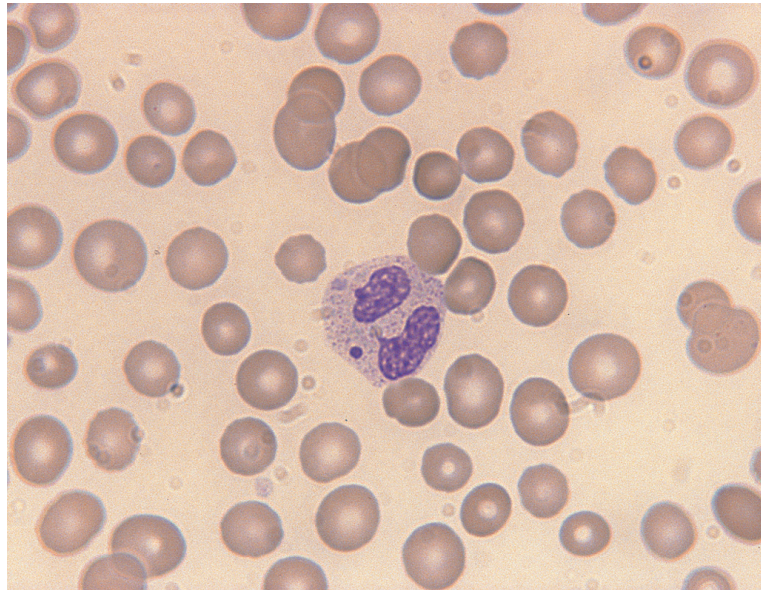


FIGURA 3.80 Distensão sanguínea de paciente sob poliquimioterapia para linfoma mostrando um neutrófilo com um fragmento nuclear destacado (inclusão equivalente ao corpo de Howell-Jolly).



de lipídios pode causar tumefação dos neutrófilos, degranulação e vacuolização, que podem durar 6-8 horas [217].

Granulação aumentada

Um exagero na granulação dos neutrófilos, com grânulos que parecem maiores e mais basófilos do que os normais, denomina-se granulação tóxica (Figura 3.82). Quando a maturação dos neutrófilos é normal, os grânulos azurófilos ou primários tornam-se menos intensamente azurófilos à medida que a célula amadurece, de modo que, em vez de corarem-se

de vermelho-purpúreo, coram-se de violeta, ou não se coram mais. Nos neutrófilos com granulações tóxicas, os grânulos primários permanecem intensamente azurófilos; isso pode decorrer de uma concentração de mucossustâncias ácidas superior à dos neutrófilos normais [218]. Degranulação pode produzir neutrófilos com granulações tóxicas e, ao mesmo tempo, com um número reduzido de grânulos. Embora a granulação “tóxica” seja característica da infecção, ela é inespecífica, sendo vista, da mesma forma, na presença de vários tipos de dano tecidual. É, também, uma das características da gravidez

TABELA 3.9 Algumas alterações e anomalias do citoplasma dos neutrófilos

Anormalidade		Presença notada em
Granulação reduzida		Síndromes mielodisplásicas e leucemia mieloide aguda Deficiência de grânulos específicos (lactoferrina) [161] Síndrome das plaquetas cinzentas (algumas famílias) [192] Neutropenia severa congênita devida a mutação <i>VPS45</i> [162]
Granulação aumentada		Granulação tóxica – gravidez, infecção, inflamação, tratamento com G-CSF e GM-CSF [193, 194] Anemia aplástica Síndromes hipereosinofílicas Anomalia de Alder-Reilly Leucemia neutrofílica crônica [171] Síndromes mielodisplásicas (raramente) [195] Mielocatexe [149]
Granulação anormal		Síndrome de Chédiak-Higashi e anomalias relacionadas [196,197] Grânulos pseudo-Chédiak-Higashi em neoplasias hematológicas Anomalia de Alder-Reilly Leucemia mieloide aguda [198] e síndromes mielodisplásicas [195]
Bastões de Auer		Leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas
Outras inclusões cristalinas		Leucemia mieloide aguda [199]
Vacuolização		Infecção, tratamento com G-CSF e GM-CSF Intoxicação alcoólica aguda [200, 201] Anomalia de Jordan [202] Deficiência de carnitina Kwashiorkor [203] Mielocatexe (algumas famílias) [149, 204]
Corpos de Döhle e inclusões similares		Infecção, inflamação, queimaduras, gravidez, tratamento com G-CSF Leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas Distúrbios ligados a <i>MYH9</i> (anomalia de May-Hegglin, síndromes de Fechtner [205] e Sebastian) Kwashiorkor [203] Mielocatexe [149]
Inclusões de actina		Anomalia congênita associada com anemia e pele cinzenta [206]
Material fagocitado	Bactérias e fungos	Infecções bacterianas e fúngicas
	Parasitas	Leishmaniose, malária (raramente)
	Crioglobulina	Mieloma múltiplo e outras crioglobulinemias
	Mucopolissacarídio	Vários carcinomas [7] Tumor de Wilms Doença de Hirschsprung [207]
	Nucleoproteína	Lúpus eritematoso sistêmico [208] (célula LE)
	Melanina	Melanoma [209]
	Bilirrubina (cristalina ou amorfa)	Hiperbilirrubinemia severa [210, 211]
	Cristais de cistina	Cistinose [212]
	Hemossiderina	Sobrecarga de ferro [213]
	Eritrócitos	Anemia hemolítica autoimune, hemoglobinúria paroxística a frio [214], transfusão incompatível, intoxicação por clorato de potássio
	Plaquetas	Septicemia por <i>Citrobacter freundii</i> [215], associada com satelitismo EDTA-dependente [216]

G-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas; GM-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas e macrofágicas.

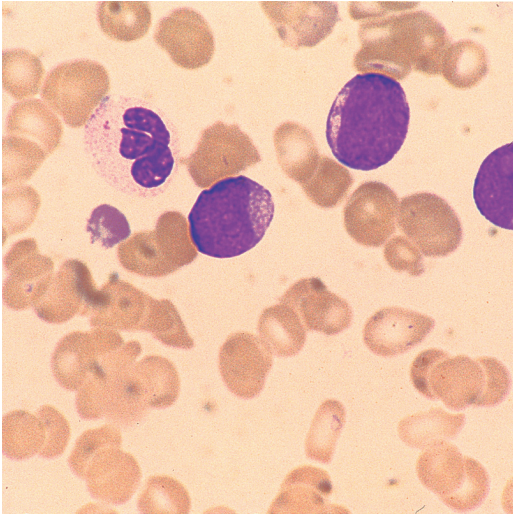


FIGURA 3.81 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mieloide aguda mostrando três blastos e um neutrófilo hipogranulado.

normal, e ocorre como resposta à terapia com citocinas (G-CSF e GM-CSF), mesmo na ausência de infecção. Em recém-nascidos, a granulação tóxica pode significar infecção bacteriana, mas pode resultar também de asfíxia grave ao nascimento, aspiração de mecônio ou de corioamnionite materna (caso em que o bebê não está infectado mas as citocinas atravessam a placenta) [85]. As Figuras 3.83 e 3.84 e a Tabela 3.9 mostram outras causas de granulação exagerada nos neutrófilos.

Granulação anormal e bastões de Auer

Granulação neutrófila anormal é vista em diversos defeitos genéticos, incluindo a síndrome de Chédiak-Higashi e o grupo heterogêneo de condições que causam a anomalia de Alder-Reilly (Tabela 3.10). A anomalia de Alder-Reilly ocorre como uma anormalidade isolada, em associação com uma peroxidase anormal [220] e como uma das características da doença de Tay-Sachs, da doença de Batten-Spielmeyer-Vogt, ou das mucopolissacaridoses. Os neutrófilos anormais apresentam granulação exagerada, lembrando a granulação tóxica, ou grânulos grandes, claramente anormais (ver Figura 3.84). Na síndrome de Chédiak-Higashi (Figura 3.85), os grânulos anormais têm características tintoriais variáveis, e alguns lembram corpos de Döhle; em nível ultraestrutural, porém, são grânulos anormais, e não retículo endoplasmático rugoso, sendo formados pela fusão de grânulos primários uns com os outros e com grânulos secundários. Há relatos de casos com granulação neutrófila, lembrando a da síndrome de Chédiak-Higashi, mas com aspectos atípicos [196]. Em uma síndrome aparentemente distinta, a granulação anormal de todas as células mieloides maduras estava associada a atresia dos ductos biliares e lúcido reticular [211]. Foram descritas inclusões gigantes compostas por actina, de coloração azul-brilhante, nos neutrófilos e em outros leucócitos de um lactente com anemia e descoloração cinzenta da pele [206] (Figura 3.86) e em um segundo bebê sem anomalias associadas [221]. Algumas

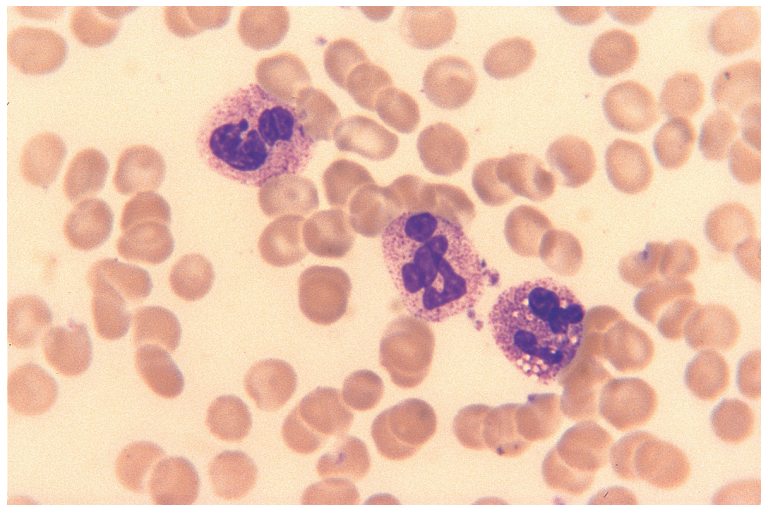


FIGURA 3.82 Três neutrófilos em distensão de sangue de paciente com infecção bacteriana mostrando granulação tóxica e vacuolização.

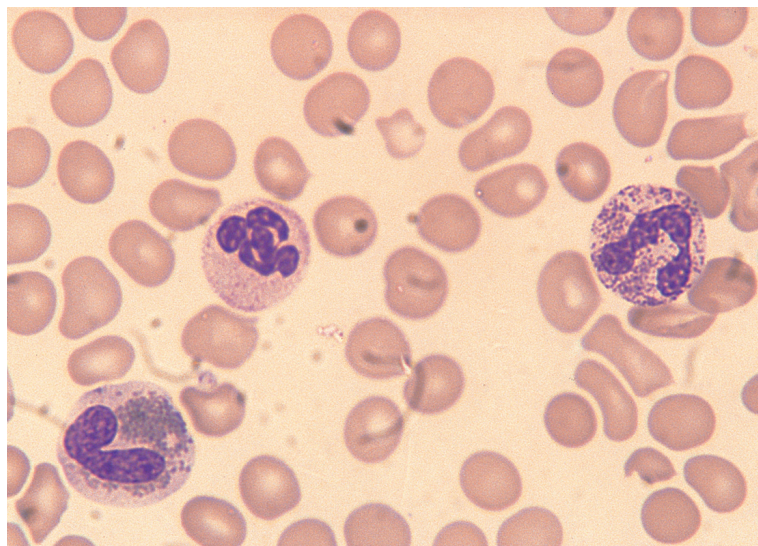


FIGURA 3.83 Distensão sanguínea de paciente com síndrome hipereosinofílica idiopática, mostrando um neutrófilo normal, um neutrófilo com granulação exagerada e um eosinófilo bastonado hipogranulado.

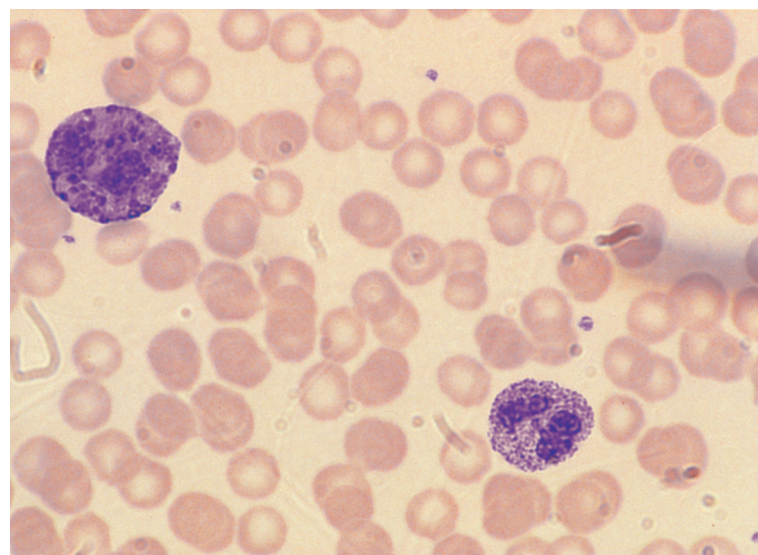


FIGURA 3.84 Distensão sanguínea de paciente com a síndrome de Maroteaux-Lamy mostrando a anomalia de Alder-Reilly dos neutrófilos. O neutrófilo tem grânulos que lembram granulação tóxica. O outro granulócito é provavelmente um eosinófilo com grânulos que apresentam características tintoriais anormais. Cortesia do Sr. Allan Dean, Nottingham.

vezes, pacientes com SMDs ou LMA apresentam neutrófilos com grânulos gigantes, morfologicamente semelhantes aos da síndrome de Chédiak-Higashi [198] (Figura 3.87).

O bastão de Auer, visto na LMA e em alguns subtipos das SMDs é formado pela fusão de grânulos primários. Bastões de Auer costumam estar presentes apenas em células blásticas (Figura 3.88), mas podem ser vistos ocasionalmente em células mais maduras, inclusive neutrófilos (Figura 3.89) quando fazem parte do clone neoplásico.

Vacuolização

A vacuolização do citoplasma dos neutrófilos pode resultar da fusão de grânulos com um vacúolo fagocítico, com subsequente exocitose do conteúdo do lisossomo secundário. É geralmente um aspecto de infecção (ver Figura 3.82) e pode ser acompanhada de degranulação parcial do neutrófilo. Em recém-nascidos, pode haver vacuolização decorrente de enterocolite necrotizante ou candidíase, além de infecção bacteriana [85]. Vacuolização de neutrófilos também pode decorrer de efeito tóxico da ingestão

TABELA 3.10 Condições hereditárias nas quais os leucócitos têm grânulos anormais ou inclusões citoplasmáticas

Anormalidade (genética)	Características associadas	Morfologia dos grânulos ou inclusões	Natureza dos grânulos ou inclusões	Células afetadas
Anomalia de Chédiak-Higashi (autossômica recessiva)	Anemia, neutropenia, trombocitopenia, icterícia, anormalidades neurológicas, infecções recorrentes	Grânulos gigantes com cor que varia do cinza ao vermelho	Grânulos secundários (específicos) gigantes	Neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito, linfócito, melanócito, dos túbulos renais, muitas outras células
Anomalia de Alder-Reilly (autossômica recessiva)	Doença de Tay-Sachs, Mucopolissacaridoses (síndrome de Hunter,* síndrome de Sanfilippo, síndrome de Morquio, síndrome de Scheie, síndrome de Maroteaux-Lamy, deficiência de β -glicuronidase), deficiência múltipla de sulfatases [219], associada com mieloperoxidase anormal [220]	Inclusões vermelho-escuras ou purpúreas, que podem lembrar granulações tóxicas, inclusões ou vacúolos em linfócitos	Mucopolissacarídeo ou outro carboidrato anormal	Neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito (raramente), linfócito
Anomalia de May-Hegglin (autossômica dominante)	Trombocitopenia, plaquetas gigantes	Lembram os corpos de Döhle	Área amorfa do citoplasma contendo estruturas relacionadas com os ribossomos	Neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito

*A síndrome de Hunter é recessiva ligada ao sexo.

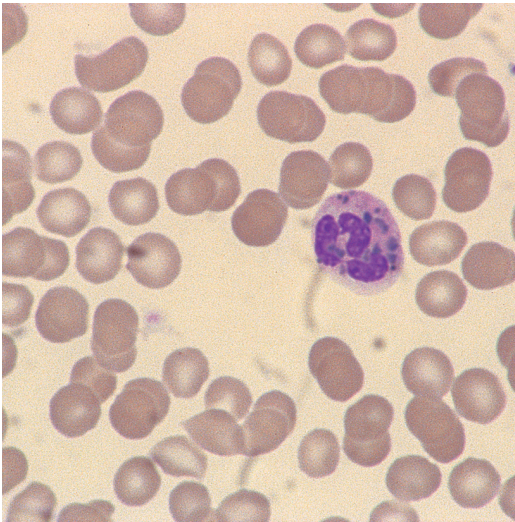


FIGURA 3.85 Distensão sanguínea de paciente com a síndrome de Chédiak-Higashi, mostrando um neutrófilo com grânulos gigantes e de coloração anormal. Cortesia do Dr. J. McCallum, Kirkaldy.

de álcool [200] (Figura 3.90), mas isso é menos comum do que vacuolização apenas nas células mieloides precursoras; atribui-se a vacuolização tanto à invaginação da membrana com inclusão de plasma como à tumefação e ruptura mitocondrial [201]. Infusão intravenosa de lipídios pode causar vacuolização [217]. Vacúolos grandes e evidentes, decorrentes da lise de eritrócitos fagocitados, são eventualmente vistos na hemoglobinúria paroxística noturna. A toxicidade da colchicina causa vacuolização [190]. Vacuolização pode ocorrer em insuficiência hepática. É um dos aspectos da displasia neutrofílica adquirida associada com anomalia cromossômica 17p–.

Vacuolização de neutrófilos decorrente de anormalidades hereditárias é um evento raro. Acontece, junto com vacuolização dos precursores neutrófilos, monócitos, alguns eosinófilos, basófilos e linfócitos, em um defeito familiar designado anomalia de Jordan [202, 222]; as células contêm lipídio neutro que é corável com vermelho-óleo O e os

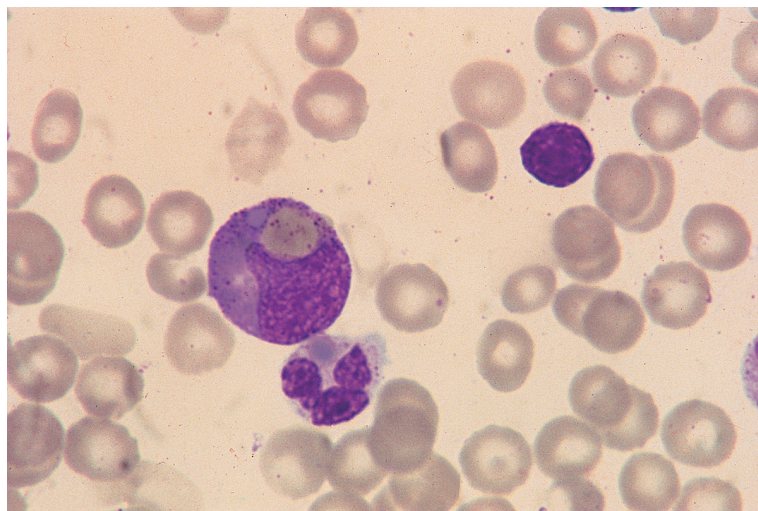


FIGURA 3.86 Distensão de medula óssea de paciente com inclusões de actina (síndrome de Brandalise) mostrando inclusões azuis em um neutrófilo e um promielócito. Foram encontradas inclusões similares em neutrófilos do sangue periférico, assim como em eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Cortesia do Dr. R.C. Ribeiro, Memphis.

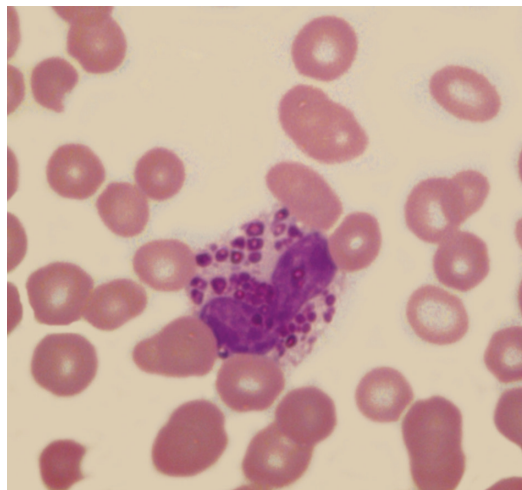


FIGURA 3.87 Distensão sanguínea de paciente com síndrome mielodisplásica mostrando neutrófilo com grânulos pseudo-Chédiak-Higashi.

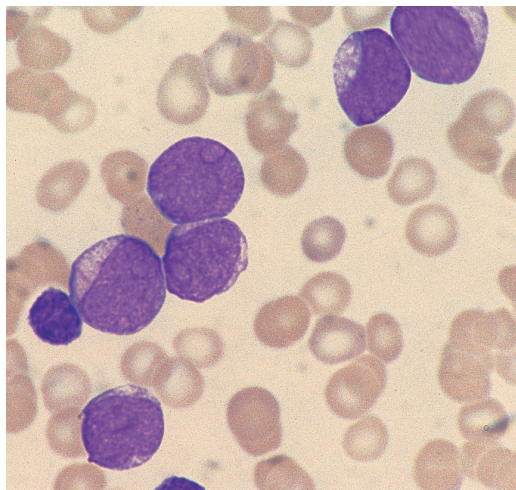


FIGURA 3.88 Distensão de sangue periférico de paciente com leucemia mieloide aguda mostrando blastos, um deles com bastão de Auer.

vacúolos decorrem da dissolução do lipídio [222]. Os pacientes originais de Jordan podem ter tido deficiência de carnitina, que causa miopatia com acúmulo de lipídios nos neutrófilos [223]. Vacúolos similares nos neutrófilos ocorrem na doença de armazenamento de lipídios neutros (também conhecida como doença de armazenamento de triglicerídios com diminuição da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, ou ainda como síndrome de Dorfman-Chanarin [224, 225]). Dois defeitos genéticos podem causar doença de armazenamento de lipídio neutro, mutação de *ABHD5* e mutação de *PNPLA2*.

Vacuolização de neutrófilos, junto com acantocitose, tem sido observada na deficiência de cadeia média da acil-CoA desidrogenase [94]. Vacuolização de neutrófilos é também observada em algumas famílias com mielocatexa [204] e na síndrome WHIM (verrugas [Warts], hipogamaglobulinemia, infecções e mielocatexa). Há vacuolização de neutrófilos na deficiência de grânulos específicos.

Corpos de Döhle e inclusões similares

Corpos de Döhle são pequenas inclusões citoplasmáticas de cor azul-pálida ou azul-acinzentada,

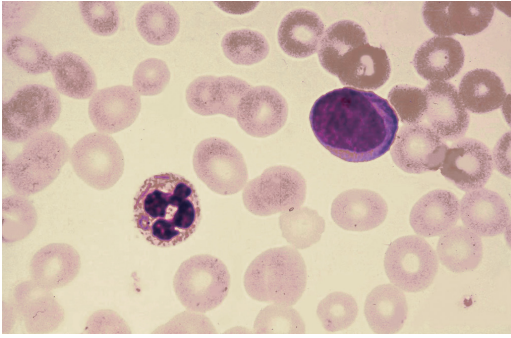


FIGURA 3.89 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mieloide aguda, mostrando um blasto e um neutrófilo maduro com bastões de Auer. Cortesia do Professor Daniel Catowsky, Londres.

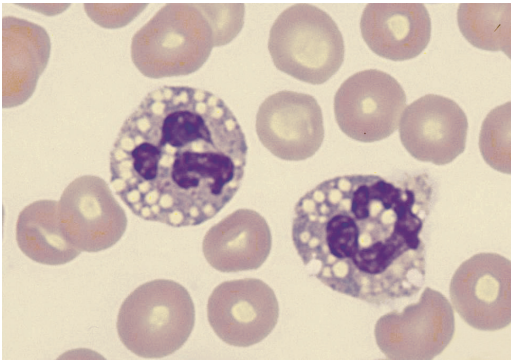


FIGURA 3.90 Distensão sanguínea de paciente com grande ingestão alcoólica, mostrando vacuolização proeminente dos neutrófilos. Cortesia da Dra. Wendy Erber, Perth, Austrália.

isoladas ou múltiplas, em geral encontradas próxima à periferia da célula (Figura 3.91); geralmente medem 1-2 μm de diâmetro, mas podem chegar a 5 μm . Em nível ultraestrutural, são compostos por fios de retículo endoplasmático, dispostos em paralelo, junto com grânulos de glicogênio [226]. Seu componente ribossômico é evidenciado pela coloração rosa com o corante verde-metil-pironina e pela destruição pela ribonuclease; são evidenciados com mais facilidade em distensões feitas com sangue não anticoagulado [227]. Corpos de Döhle estão associados à gravidez, a estados infecciosos e inflamatórios, a queimaduras (Figura 3.92) e à administração de citocinas como o G-CSF e o GM-CSF. Podem ser vistos nas SMDs e na LMA, tendo sido descritos na anemia perniciosa, na policitemia vera, na LMC, em anemias hemolíticas, na granulomatose

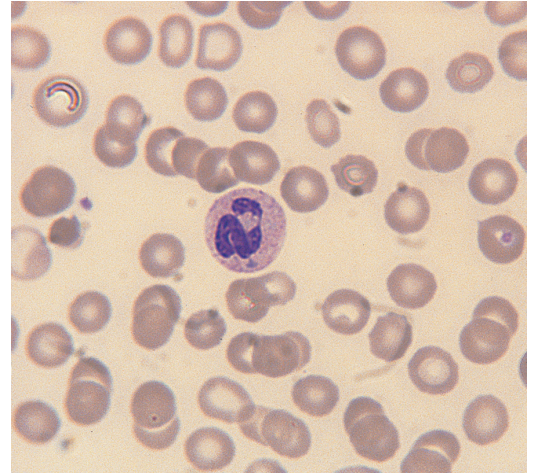


FIGURA 3.91 Distensão sanguínea de paciente com septicemia mostrando um corpo de Döhle em um neutrófilo.

com poliangiite (antes denominada granulomatose de Wegener) e após o uso de quimioterápicos anti-blásticos [228].

A presença de grandes inclusões, semelhantes a corpos de Döhle, numerosas e claramente definidas, é uma das características dos distúrbios relacionados a *MYH9*, que incluem a anomalia de May-Hegglin e as síndromes de Alport, de Epstein, de Fechtner e de Sebastian (ver Tabela 8.13) e são também caracterizadas por trombocitopenia com plaquetas gigantes (Figura 3.93). As inclusões têm

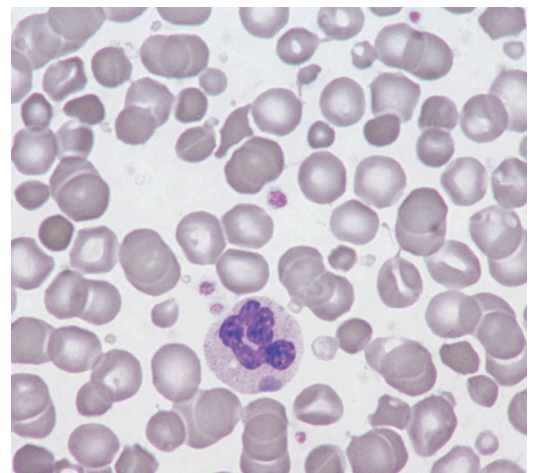


FIGURA 3.92 Distensão sanguínea de paciente com queimaduras extensas mostrando um corpo de Döhle proeminente. Os eritrócitos também mostram alterações causadas pela queimadura.

formato de fuso ou de crescente, estão distribuídas ao acaso na célula, não na margem celular, e coram-se mais intensamente do que os corpos de Döhle. Em âmbito ultraestrutural, diferem dos corpos de Döhle dos estados reacionais; elas aparecem como uma área amorfa, desprovida, em grande parte, de organelas, com frequência parcialmente circundada por um único filamento de retículo endoplasmático rugoso e contendo alguns bastões densos e partículas esféricas, que são, provavelmente, ribossomos [226, 229]. Inclusões de May-Hegglin são compostas principalmente por uma forma mutante de cadeia pesada IIa da proteína miosina não muscular [230]; não contêm grânulos de glicogênio [226].

Corpos de Döhle são raros em indivíduos normais. Em um trabalho, eles foram vistos em 3 dentre 20 indivíduos sadios, com uma frequência média de 0,1 para 100 células [228]. Na gravidez, o número de corpos de Döhle para 100 células aumenta paralelamente à contagem de leucócitos [227]; a frequência aumentada persiste durante o período pós-parto.

Inclusões exógenas nos neutrófilos

Como são fagócitos, os neutrófilos podem conter inclusões que representam material fagocitado, como microrganismos ou crioglobulina. Pigmento malárico ocasionalmente é visto em neutrófilos (Figura 3.94), mas é mais comum em monócitos; a

presença de parasitos fagocitados é ainda mais rara (Figura 3.95). Crioglobulina (Figura 3.96) pode ser vista como inclusões arredondadas, levemente basófilas, isoladas ou múltiplas ou como uma única grande inclusão que desloca o núcleo. A fagocitose de crioglobulina ocorre *in vitro*, quando se deixa o sangue parado, e não *in vivo* [231]. Um depósito púrpura-acinzentado, que não era uma crioglobulina, mas provavelmente imunocomplexos, foi descrito em um paciente com linfoma esplênico com linfócitos vilosos [232]. O mucopolissacarídeo anormal, que circula no sangue de pacientes com doenças malignas, pode ser ingerido por neutrófilos [7]. A formação de células do lúpus eritematoso (LE) geralmente é um fenômeno *in vitro*, mas eventualmente podem ser vistas células LE no sangue periférico (Figura 3.97) de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico severo [208]. Na cistinose podem ser notados cristais de cistina, quadrados ou retangulares, em leucócitos do sangue periférico; são mais fáceis de detectar com microscopia de contraste de fase [212]. Em um caso de intoxicação por colchicina, foram observadas grandes inclusões citoplasmáticas [233]. Há uma descrição de glóbulos refráteis amarelos de hemossiderina em um paciente com talassemia maior, com sobrecarga de ferro e sepsse [213].

Neutrófilos também podem ingerir eritrócitos, fenômeno denominado eritrofagocitose (ou

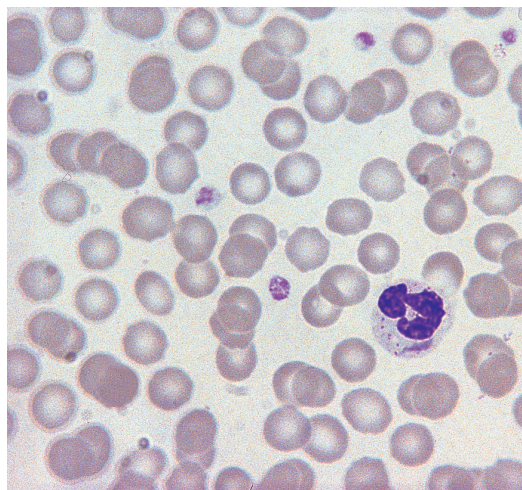


FIGURA 3.93 Distensão sanguínea de paciente com a anomalia de May-Hegglin mostrando uma inclusão de May-Hegglin que lembra um corpo de Döhle. Também são vistas plaquetas gigantes. Cortesia do Dr. Norman Parker, Londres.

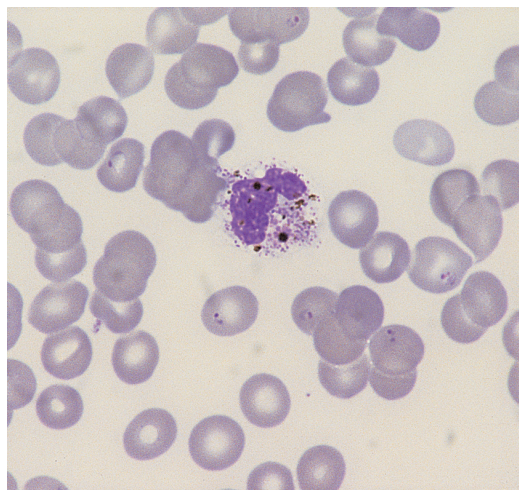


FIGURA 3.94 Distensão sanguínea de paciente com malária causada por *Plasmodium falciparum* mostrando pigmento malárico em um neutrófilo e formas em anel do parasito no interior de eritrócitos.

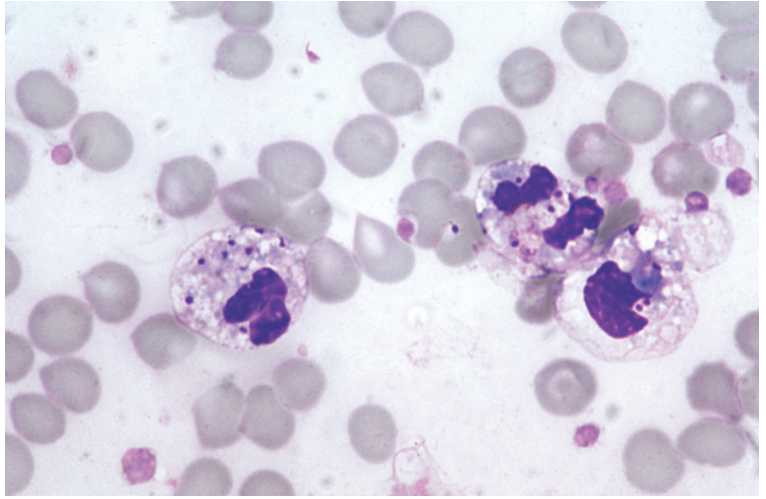
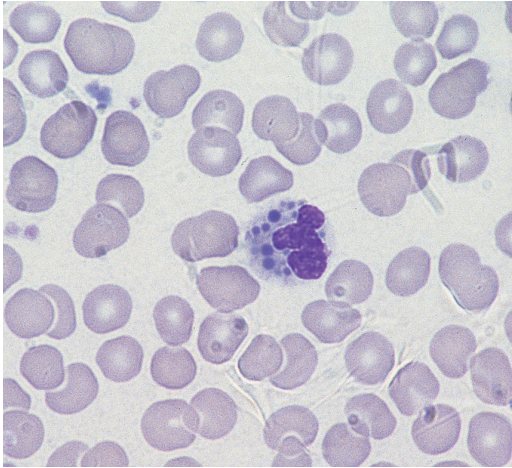
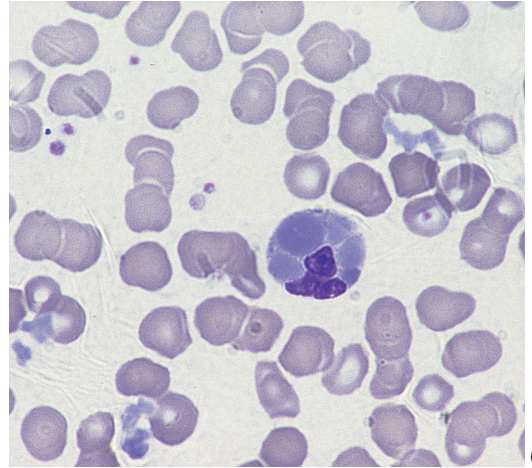


FIGURA 3.95 Distensão sanguínea de paciente com malária mostrando microgametócitos de *Plasmodium vivax* fagocitados por neutrófilos.



(a)



(b)

FIGURA 3.96 Distensão sanguínea de paciente com crioglobulinemia mostrando crioglobulina ingerida pelos neutrófilos, que aparece como (a) pequenas inclusões arredondadas, e (b) grandes massas ocupando o citoplasma e deslocando o núcleo. Nota-se também um pouco de crioglobulina extracelular. Cortesia do Sr. Alan Dean.

eritrofagia). Esse fenômeno pode ser observado em anemias hemolíticas autoimunes, na hemoglobinúria paroxística a frio, em exacerbações da doença de crioaglutininas, em outros pacientes com teste de Coombs direto positivo e na hemólise causada por picadas de serpentes, neste caso com ou sem teste de Coombs positivo [234]. Eritrofagocitose é vista, também, em pacientes com eritrócitos defeituosos, como na anemia de células falciformes e na hemoglobinopatia S/C, bem como em qualquer anemia hemolítica severa, dependente de defeito intrínseco do eritrócito. Foi descrito um paciente com

anemia hemolítica severa e extrema eritrofagocitose por neutrófilos (um terço destes em fagocitose), na ausência de autoanticorpo detectável; a anemia foi responsiva a corticoide e esplenectomia [235]. Foi descrita eritrofagocitose em um paciente em uso de G-CSF e GM-CSF, provavelmente causada por este último fármaco [236]. Neutrófilos anormais mostrando eritrofagocitose acentuada foram descritos em um paciente com leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) [237].

Fagocitose de melanina está descrita em pacientes com melanoma metastático (Figura 3.98).

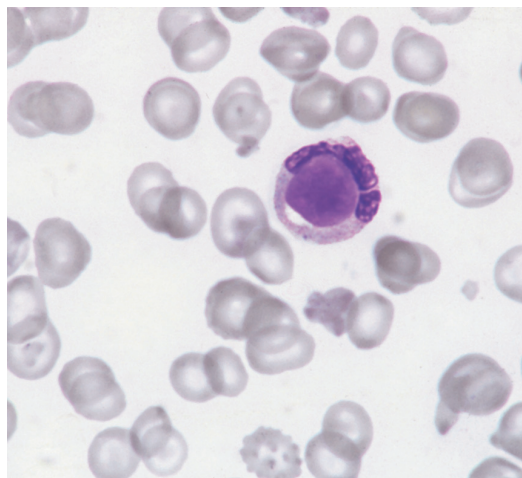


FIGURA 3.97 Distensão sanguínea mostrando uma célula LE espontaneamente formada.

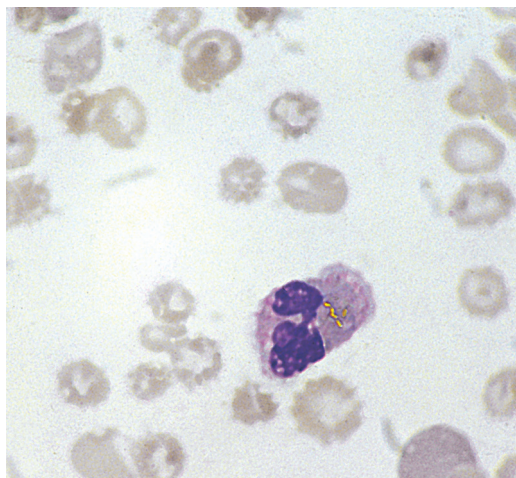


FIGURA 3.99 Distensão sanguínea de bebê mostrando um neutrófilo contendo cristais refráteis de bilirrubina. Cortesia do Dr. Sudharma Vidyatilake, Colombo.

Cristais de bilirrubina, refráteis e amarelados, são vistos raramente em bebês com hiperbilirrubinemia extrema (Figura 3.99); formam-se *in vitro*, no sangue anticoagulado com EDTA, se deixado por mais de 30 minutos [238]. Inclusões citoplasmáticas grosseiras, de cor verde-brilhante, foram descritas em dois pacientes com insuficiência hepática [239].

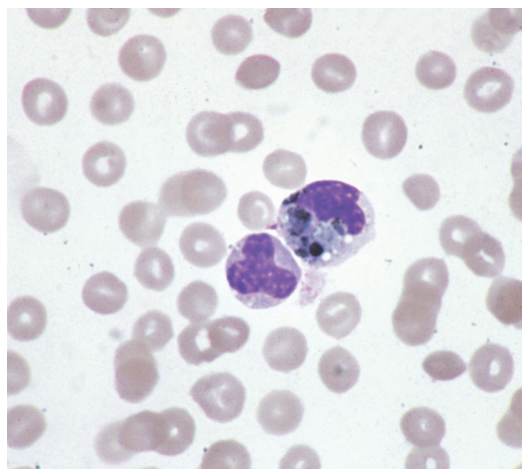


FIGURA 3.98 Distensão sanguínea mostrando um neutrófilo contendo melanina, em paciente com melanoma disseminado. Cortesia do Dr. John Luckit, Londres, e do falecido Dr. David Swirsky.

Outras anormalidades da morfologia dos neutrófilos

Macropolícitos

O macropolícito tem aproximadamente o dobro do tamanho de um neutrófilo normal (Figura 3.100), com diâmetro de 15-25 μm , em vez de 12-15 μm ; a análise do conteúdo de DNA mostra que é tetraploide, em vez de diploide, havendo aumento proporcional do número de lóbulos nucleares. Alguns macropolícitos são visivelmente binucleados (Figura 3.101). Macropolícitos são vistos ocasionalmente no sangue de indivíduos saudáveis. Um número aumentado de macropolícitos caracteriza uma condição hereditária (autossômica dominante), na qual 1 a 2% dos neutrófilos são gigantes, com núcleos de 6 a 10 lóbulos, ou núcleos duplos, em imagem de espelho [240]. Um número aumentado de macropolícitos, com alterações displásicas não específicas, está descrito na síndrome de DiGeorge [241]. Macropolícitos, inclusive binucleados, são comuns após administração de G-CSF [193], bem como em anemias megaloblásticas. Nas anemias megaloblásticas, costumam ter um conteúdo de DNA variado, entre o diploide e o tetraploide [146]; ao contrário dos neutrófilos hipersegmentados, eles são derivados de metamielócitos gigantes. São vistos em infecções crônicas, na LMC, em outras neoplasias mieloproliferativas e após a administração de drogas citotóxicas e antimetabólitos. A maioria dos macropolícitos tem as

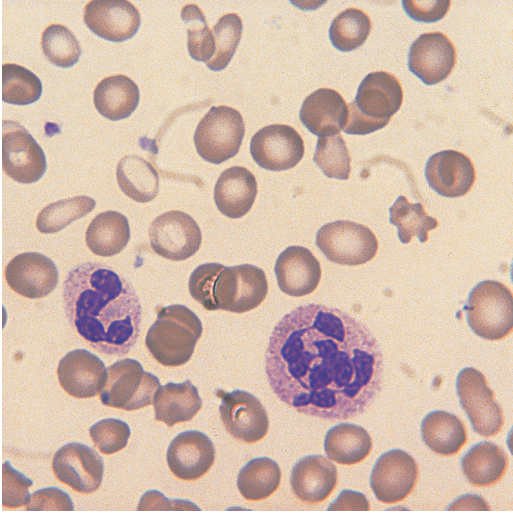


FIGURA 3.100 Distensão sanguínea de paciente com síndrome mielodisplásica mostrando um macropolicito com o dobro do tamanho do neutrófilo normal adjacente. O núcleo também tem o dobro do tamanho normal e apresenta segmentação excessiva; é provável que se trate de uma célula tetraploide. Além disso, há anisocromasia na série vermelha.

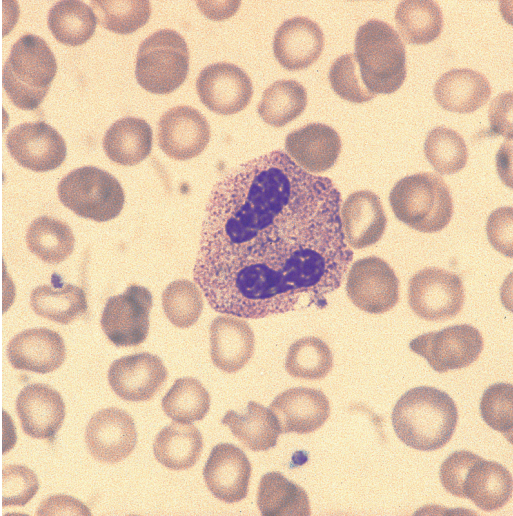


FIGURA 3.101 Distensão sanguínea de paciente com leucemia linfocítica crônica e mielodisplasia reversível induzida por clorambucil, mostrando um neutrófilo tetraploide binucleado. Cortesia do falecido Dr. P.C. Srivastava.

mesmas características tintoriais dos demais neutrófilos, mas, na anemia megaloblástica, podem ter um padrão cromatínico mais frouxo e não ter aumento do número de lóbulos [242]. Pacientes com

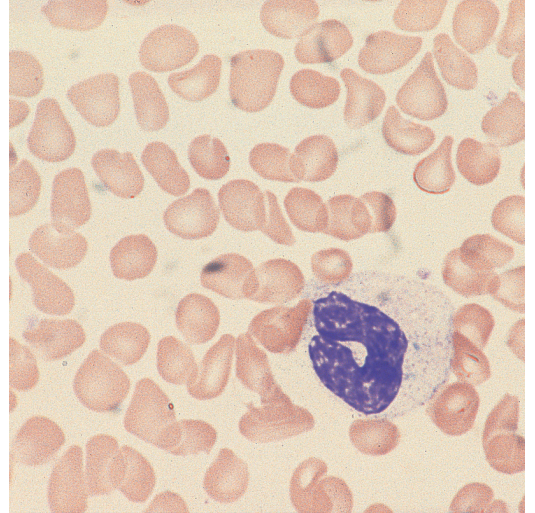


FIGURA 3.102 Sangue periférico de paciente com aids mostrando um metamielócito gigante hipogranulado, provavelmente tetraploide.

infecção pelo HIV podem apresentar não apenas macropolicitos binucleados e com padrão cromatínico frouxo, mas, também, metamielócitos gigantes circulantes (Figura 3.102), células características das anemias megaloblásticas, em geral vistas apenas na medula óssea.

Neutrófilos e outras células mieloides necrobióticas (apoptóticas)

São necrobióticas as células que morreram no sangue periférico por um processo conhecido como apoptose ou “morte celular programada”. Tais células são vistas, ocasionalmente, no sangue de indivíduos sadios e reconhecidas por seus núcleos densos, homogêneos (picnóticos), que por fim se tornam perfeitamente redondos, ou fragmentam-se em múltiplas massas densas redondas; o citoplasma mostra acidofilia intensa (Figura 3.103). Infecção é a causa mais comum de aumento do número de neutrófilos apoptóticos [243]. Na meningite meningocócica invasiva, o número de neutrófilos apoptóticos correlaciona-se com a gravidade da infecção [244]. Alguns pacientes com LMA têm muitas células mieloides necrobióticas (Figura 3.104). Em sangue deixado por muito tempo à temperatura ambiente, pode ocorrer alteração semelhante, como artefato *in vitro*. Leucócitos que degeneraram até o ponto de não se evidenciar mais o material nuclear são ditos necróticos; em geral, é um artefato resultante de estocagem prolongada.

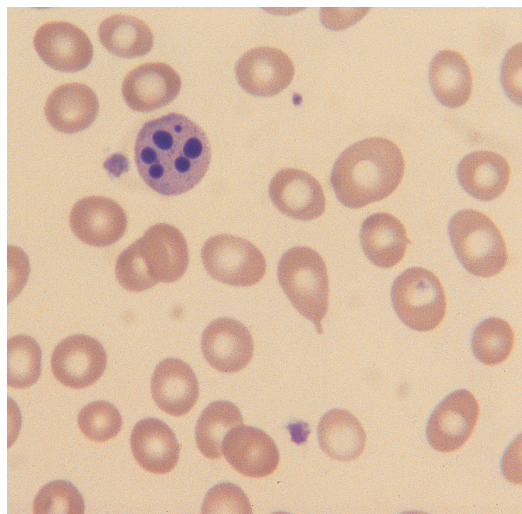


FIGURA 3.103 Distensão sanguínea de paciente com anemia megaloblástica mostrando um neutrófilo apoptótico. A cromatina condensou-se e o núcleo fragmentou-se em massas picnóticas arredondadas. A distensão também mostra anisocitose, macrocitose e um pecilócito em formato de lágrima.

Agregação de neutrófilos

Agregação de neutrófilos, acompanhada ou não de agregação de plaquetas, desenvolve-se no sangue de alguns pacientes, quando anticoagulado com EDTA e conservado *in vitro*; em alguns pacientes, pode ser o estágio final do satelitismo plaquetário. Trata-se de um fenômeno progressivo, com o passar das horas, mediado por anticorpos e sem significado clínico, mas que pode causar erro nas contagens automatizadas de leucócitos. A agregação também

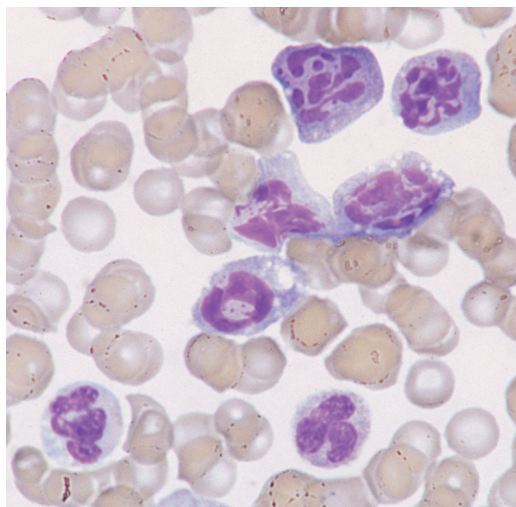


FIGURA 3.104 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mieloide aguda mostrando cinco células leucêmicas apoptóticas.

tem sido observada como um fenômeno transitório na mononucleose infecciosa [245] e em infecções bacterianas agudas (Figura 3.105). Ocasionalmente, é observada em um paciente durante vários meses ou anos, podendo, nesse caso, estar associada a uma doença autoimune (Figura 3.106). Em alguns pacientes, quando a causa é um anticorpo que age a frio, existe também aglutinação de eritrócitos.

Fragmentos de neutrófilos ou de outros leucócitos

Ocasionalmente são vistos, em pacientes em sepse [246] ou que receberam G-CSF [145], fragmentos

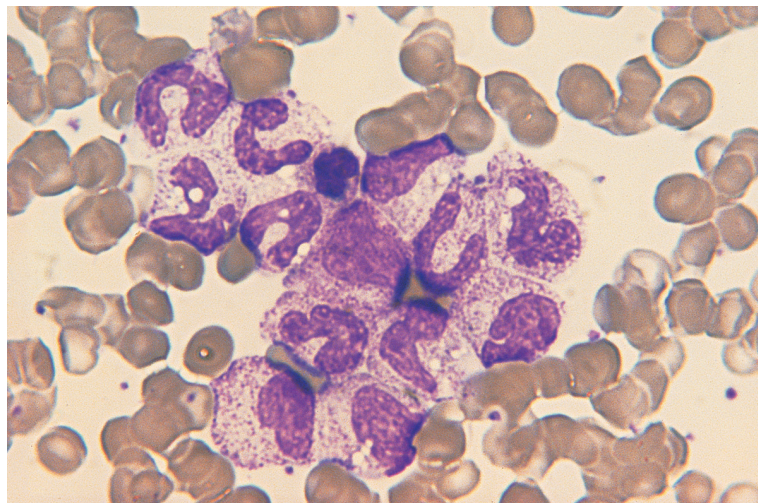
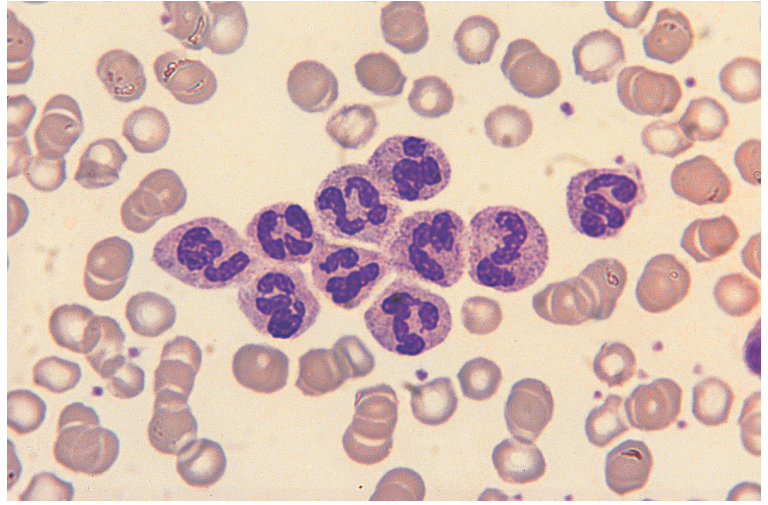


FIGURA 3.105 Distensão sanguínea de paciente com sepse avasculadora mostrando agregação dos neutrófilos, desvio à esquerda, granulação tóxica e vacuolização dos neutrófilos.

FIGURA 3.106 Distensão sanguínea de paciente com artrite reumatoide mostrando agregação dos neutrófilos causada por um anticorpo frio. Neste paciente, a agregação *in vitro* foi observada por mais de uma década, e frequentemente causou contagens leucocitárias automatizadas incorretas.



circulantes do citoplasma de neutrófilos. Fragmentação de neutrófilos também foi observada em associação com anemia hemolítica microangiopática, em um paciente no qual se formou um coágulo na extremidade de um cateter de diálise [247]; é provável que o mecanismo tenha sido o dano mecânico aos neutrófilos. Células neoplásicas, como blastos leucêmicos, são especialmente sujeitas à fragmentação; não é raro notá-la na LMA (ver Figura 4.2).

O eosinófilo

O eosinófilo (Figura 3.107) é um pouco maior do que o neutrófilo, com um diâmetro de 12-17 μm .

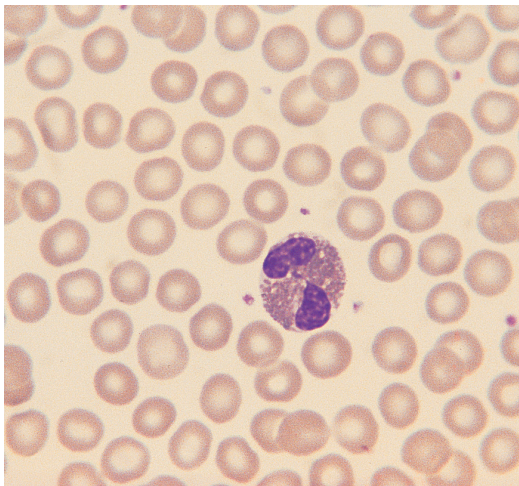


FIGURA 3.107 Eosinófilo em distensão de sangue periférico de um indivíduo sadio.

O núcleo em geral é bilobulado, mas pode ser trilobulado; a contagem lobular média é de aproximadamente 2,3. Nas mulheres, os eosinófilos podem apresentar *drumsticks* (Figura 3.108), mas, como a frequência se relaciona ao grau de lobulação do núcleo, são raros. Os grânulos dos eosinófilos são esféricos e consideravelmente maiores do que os dos neutrófilos; eles enchem o citoplasma e coram-se de laranja-avermelhado. O citoplasma dos eosinófilos é levemente basófilo, com ribossomos e retículo endoplasmático rugoso mais abundantes do que nos neutrófilos; quando ocorre degranulação, pode-se ver o citoplasma azul-pálido.

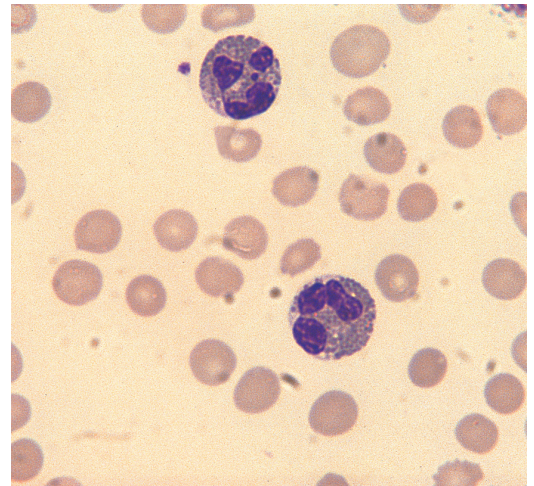


FIGURA 3.108 Distensão sanguínea de paciente feminina com síndrome hipereosinofílica (SHE) idiopática mostrando dois eosinófilos, um dele com um *drumstick*.

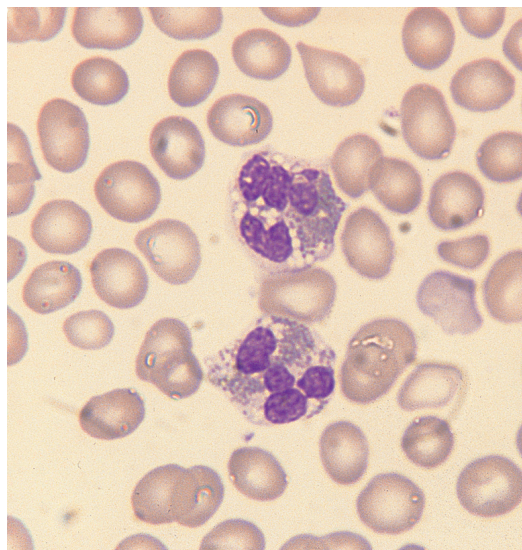


FIGURA 3.109 Distensão sanguínea de paciente com SHE idiopática mostrando hipersegmentação dos eosinófilos. Ambos têm núcleos com quatro lóbulos.

Raros eosinófilos de indivíduos saudáveis podem conter alguns grânulos com características tintoriais basófilas.

Anormalidades nucleares dos eosinófilos

Eosinófilos podem mostrar hipersegmentação nuclear (Figura 3.109), hipossegmentação (Figura 3.110) ou núcleo em formato de anel (Figura

3.111). Pode ocorrer hipersegmentação em anemias megaloblásticas. Também pode ser uma característica genética [248]; em uma família, os eosinófilos hipersegmentados eram também hipogranulados [249] e não havia defeito clínico aparente. Aumento de lobulação acompanhado de eosinopenia foi descrito na síndrome de Down [154, 250]. Lobulação excessiva é uma característica da mielocatexse, incluindo a síndrome WHIM [149]. Na anomalia de Pelger-Huët, (Figura 3.110) e na deficiência de grânulos específicos [161], os eosinófilos também têm lobulação reduzida.

Hipersegmentação, hipossegmentação e núcleos em anel podem ser alterações adquiridas. A hipossegmentação dos eosinófilos ocorre nas síndromes mieloproliferativas, incluindo a mielofibrose primária, e nas SMDs (Figura 3.112). Nas SMDs, a cromatina pode apresentar-se em grumos, e todos ou a maioria dos núcleos podem ser não lobulados [251]; esta pode ser considerada uma anomalia de Pelger-Huët adquirida, limitada aos eosinófilos. Pacientes com leucemia eosinofílica podem ter número aumentado de eosinófilos, tanto hiper quanto hipossegmentados. Eosinófilos hipossegmentados podem ocorrer em eosinofilias reacionais [252]. Eosinófilos com núcleo em anel são vistos em várias condições [204]; parecem, não ter um significado diagnóstico específico. Inclusões do tipo corpos de Howell-Jolly, provavelmente induzidas por fármaco, foram observadas em um paciente [254].

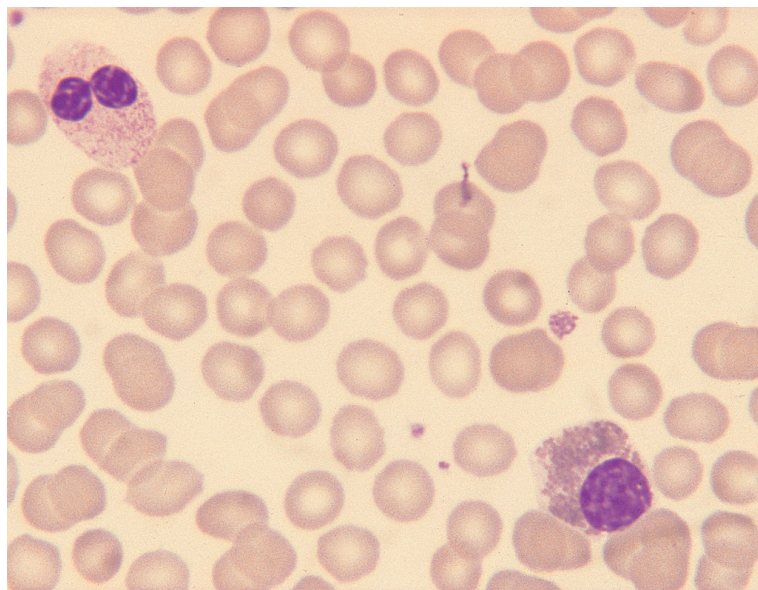


FIGURA 3.110 Distensão sanguínea de paciente com anomalia de Pelger-Huët hereditária, mostrando um neutrófilo bilobulado típico e um eosinófilo não lobulado.

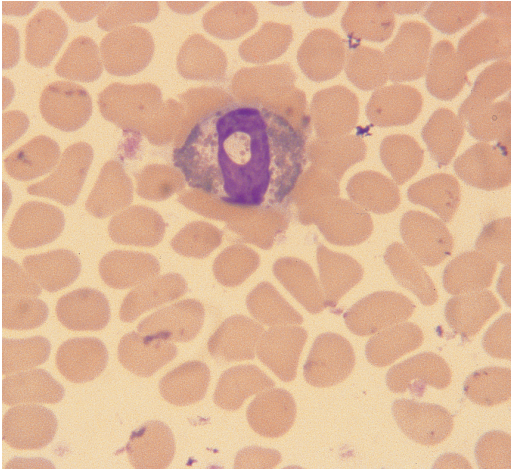


FIGURA 3.111 Distensão sanguínea de paciente com edema cíclico e eosinofilia, mostrando um eosinófilo com núcleo em formato de anel.

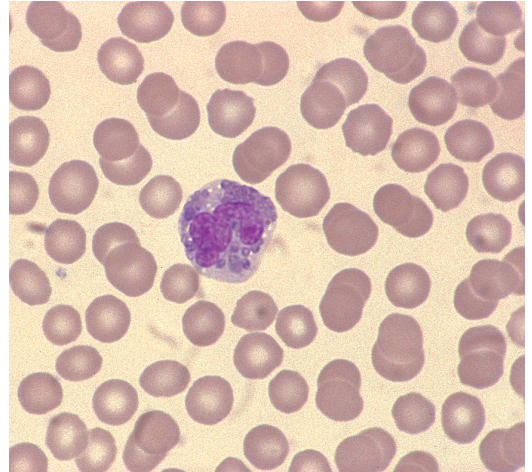


FIGURA 3.113 Distensão de sangue de paciente com síndrome de Chédiak-Higashi mostrando um eosinófilo com grânulos anormais. Cortesia do Dr. J. McCallum.

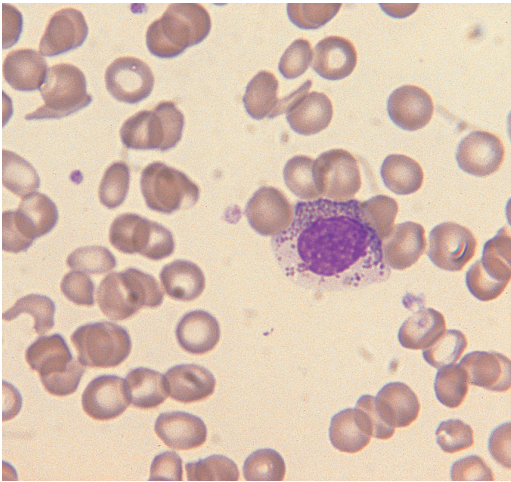


FIGURA 3.112 Distensão sanguínea de paciente com síndrome mielodisplásica mostrando um eosinófilo não lobulado e hipogranulado.

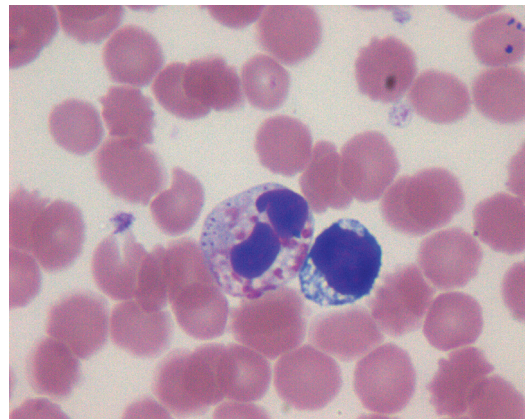


FIGURA 3.114 Um eosinófilo em distensão de sangue periférico em gangliosidose GM1 tipo 1 (deficiência de β -galactosidase 1), mostrando vacuolização e grânulos anormais; o linfócito também é vacuolizado. Cortesia do Dr. Jiří Pavlůl, Londres.

Anormalidades dos grânulos e do citoplasma dos eosinófilos

Os eosinófilos, juntamente com os neutrófilos, podem ter grânulos anormais em vários defeitos genéticos, incluindo a síndrome de Chédiak-Higashi (Figura 3.113) e a anomalia de Alder-Reilly (ver Figura 3.84 e Tabela 3.10). Na anomalia de Alder-Reilly, os grânulos dos eosinófilos podem mostrar-se cinza-esverdeados ou purpúreos com os corantes usuais [178]. Na síndrome de Chédiak-Higashi,

alguns grânulos são de cor azul-acinzentada. Eosinófilos na gangliosidose GM1 tipo 1 (deficiência de β -galactosidase 1) podem ter a um tempo grânulos de coloração anormal e vacuolização [255] (Figura 3.114).

Foi descrita, em uma família, uma anomalia autossômica dominante, na qual os eosinófilos e os basófilos apresentavam inclusões cinzentas ou cinza-azuladas [248]. Os eosinófilos apresentam inclusões citoplasmáticas na anomalia

de May-Hegglin [226] e na síndrome de Brandalise (inclusões de actina) [206].

Em distúrbios adquiridos da granulocitopoe-se, não é raro o achado de eosinófilos com alguns grânulos com características tintoriais basófilas; são grânulos imaturos, às vezes denominados “grânulos pró-eosinofílicos”. Essas células são mais frequentes na LMC (Figura 3.115), na leucemia eosinofílica e em certas categorias de LMA, nas quais os eosinófilos fazem parte do clone leucêmico, particularmente na leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia, associada à inversão do cromossomo 16. Em todos os casos citados, o exame ultraestrutural revela que os grânulos anormais são grânulos eosinófilos com características tintoriais incomuns; na LMC, também pode haver algumas células híbridas, com uma mistura de grânulos dos tipos eosinófilo e basófilo [256].

Em distúrbios adquiridos, os eosinófilos podem ser vacuolizados, ou total ou parcialmente agranulares. Em estados dismielo-poéticos, a hipogranularidade poderia ser resultado de formação defeituosa dos grânulos eosinófilos, mas, como é geralmente acompanhada de vacuolização, parece mais provável que resulte de degranulação.

Vacuolização e hipogranularidade são vistas em alguns casos, mas não todos, de leucemia eosinofílica crônica. Essas alterações, entretanto, não são específicas pois às vezes são também vistas em

eosinofilias reacionais. Por exemplo, entre 7 pacientes com eosinofilia associada a leucemia ou linfomas linfoblásticos B e T, 5 tinham eosinófilos citologicamente anormais [252].

O basófilo

O basófilo (Figura 3.116) tem tamanho semelhante ao do neutrófilo (10-14 μm de diâmetro). O núcleo é geralmente obscurecido por grânulos preto-purpúreos, com tamanho intermediário entre o dos grânulos do neutrófilo e do eosinófilo. Os núcleos dos basófilos podem ser não lobulados na anomalia de Pelger-Huët (Figura 3.117). Basófilos apresentam grânulos anormais em várias condições hereditárias (Figura 3.118; ver também Tabela 3.10).

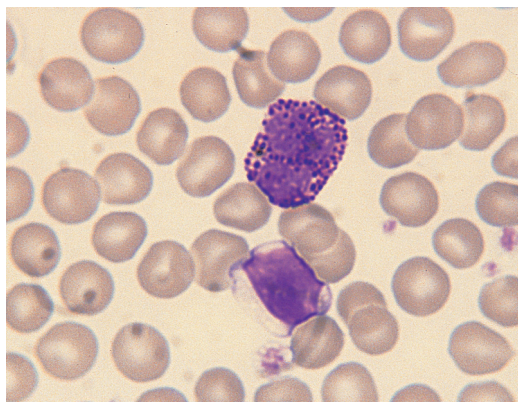


FIGURA 3.116 Um basófilo e um linfócito pequeno em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio.

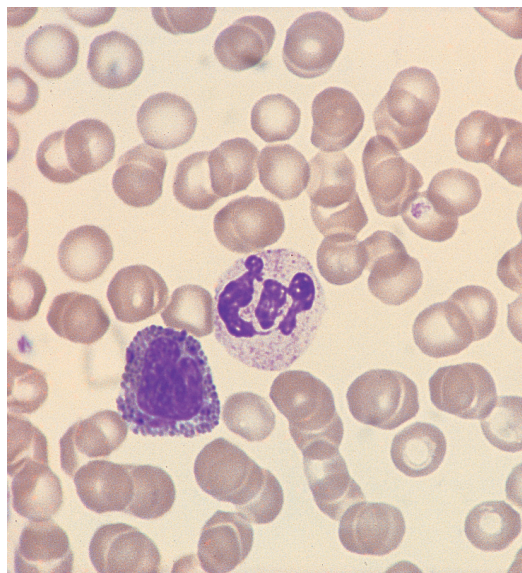


FIGURA 3.115 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mieloide crônica mostrando um neutrófilo normal e um eosinófilo com alguns grânulos basófilos.

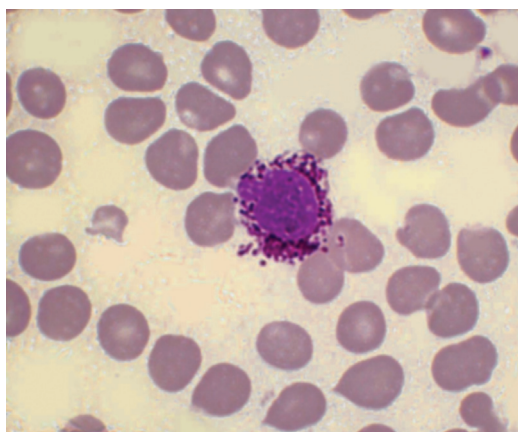


FIGURA 3.117 Distensão sanguínea de paciente com anomalia de Pelger-Huët hereditária, mostrando um basófilo hipolobulado.

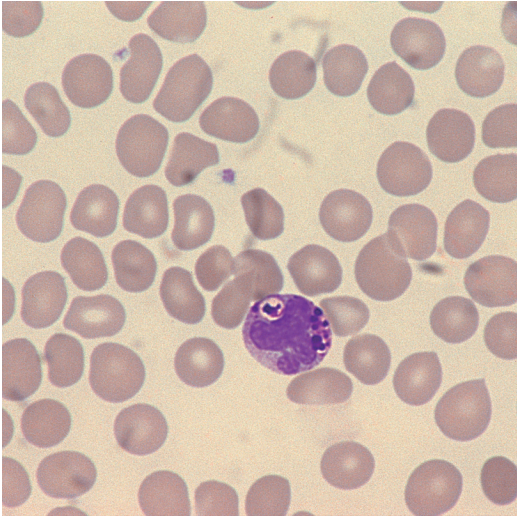


FIGURA 3.118 Distensão sanguínea de paciente com síndrome de Chédiak-Higashi mostrando um basófilo anormal. Cortesia do Dr. J. McCallum.

Os grânulos podem estar em número reduzido em neoplasias mieloproliferativas e SMDs (Figura 3.119); em condições alérgicas agudas (como urticária e choque anafilático) e durante a hiperlipidemia pós-prandial, pode ocorrer degranulação. A redução no número de grânulos também pode ser artefactual, pois os grânulos dos basófilos são altamente hidrossolúveis.

Inclusões citoplasmáticas estão presentes na anomalia de May-Hegglin [226].

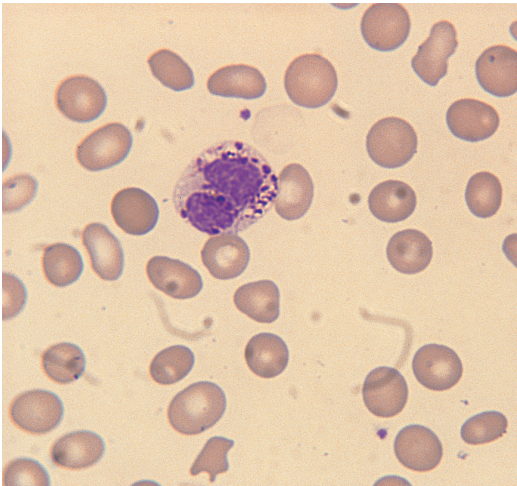


FIGURA 3.119 Distensão sanguínea de paciente com síndrome mielodisplásica mostrando um basófilo hipogranulado.

Linfócitos e plasmócitos

O linfócito

O diâmetro dos linfócitos do sangue periférico varia de 10 a 16 μm . Linfócitos pequenos (10-12 μm), que predominam, têm citoplasma escasso e núcleo redondo, ligeiramente indentado, com cromatina condensada (Figura 3.120). Linfócitos grandes (12-16 μm), que constituem cerca de 10% dos linfócitos circulantes, têm citoplasma mais abundante e cromatina nuclear menos condensada (Figura 3.121). Os linfócitos pequenos apresentam contorno circular, os grandes costumam ser um pouco irregulares. O citoplasma, por ser levemente basófilo,

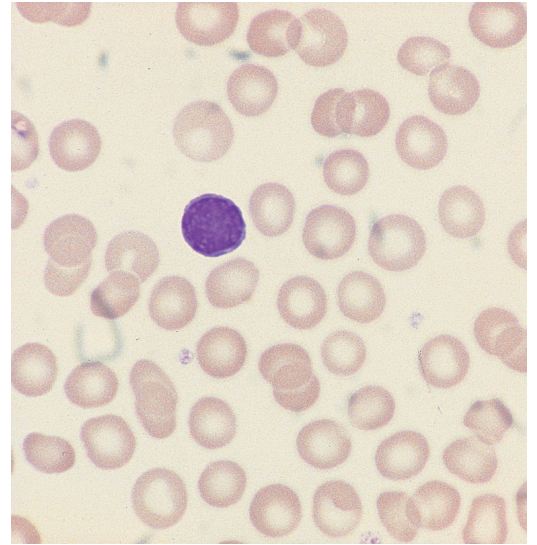


FIGURA 3.120 Um linfócito pequeno em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio.

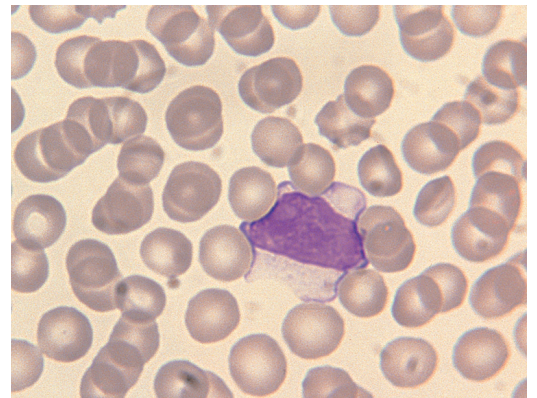


FIGURA 3.121 Um linfócito grande em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio.

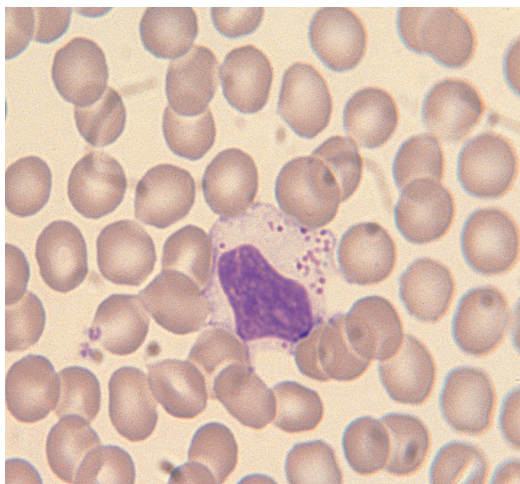


FIGURA 3.122 Um linfócito grande e granulado em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio.

cora-se em azul-pálido. Linfócitos podem apresentar pequeno número de grânulos azurófilos contendo enzimas lisossômicas; alguns linfócitos grandes, com citoplasma mais abundante, têm cerca de uma dúzia de grânulos proeminentes. Essas células são denominadas “linfócitos grandes e granulosos (ou granulares)” (Figura 3.122). Em indivíduos sadios, podem chegar a 10-15% dos linfócitos, mas em geral são menos frequentes.

Linfócitos maduros mantêm nucléolo, mas, em virtude da condensação da cromatina, geralmente não é visível nos linfócitos pequenos; nos linfócitos grandes, o nucléolo algumas vezes pode ser discernido. A condensação da cromatina, de maneira análoga, dificulta a detecção da cromatina sexual nos linfócitos, mas esta, às vezes, pode ser vista condensada sob a membrana nuclear nos linfócitos grandes, com cromatina mais frouxa [151]. Linfócitos de crianças são maiores e mais pleomórficos do que os de adultos. De modo geral, não há distinção morfológica entre os subgrupos funcionais dos linfócitos; porém, as células T citotóxicas ativadas por linfoquinas e as células *natural killer* fazem parte da população de linfócitos grandes e granulosos.

Anormalidades morfológicas dos linfócitos em condições hereditárias

Os linfócitos mostram inclusões na síndrome de Chédiak-Higashi e na anomalia de Alder-Reilly (ver Tabela 3.10). Na síndrome de Chédiak-Higashi, as inclusões são muito grandes (Figura 3.123), mas na

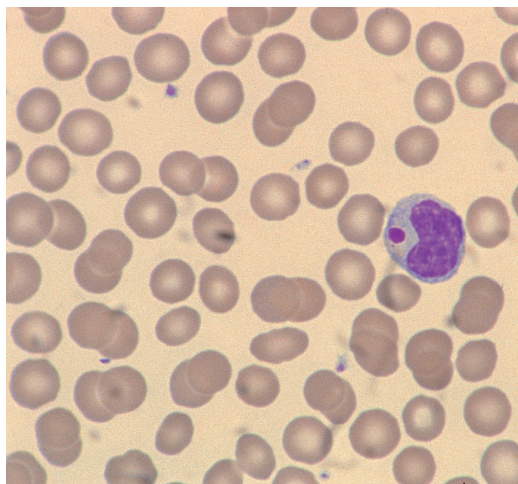


FIGURA 3.123 Distensão de sangue de paciente com síndrome de Chédiak-Higashi mostrando um linfócito com uma grande inclusão citoplasmática. Cortesia do Dr. J. McCallum.

anomalia de Alder-Reilly (Figura 3.124) são pouco maiores do que os grânulos normais dos linfócitos grandes e granulosos. Portadores heterozigotos da síndrome de Chédiak-Higashi também podem ter inclusões linfocíticas, mas em pequena porcentagem de células [257]. Na anomalia de Alder-Reilly, ocasionalmente, há inclusões nos linfócitos na ausência de anormalidades dos neutrófilos; inclusões linfocíticas são comuns quando a anomalia de Alder-Reilly é consequência da doença de Tay-Sachs ou das mucopolissacaridoses, sendo raras na síndrome de Morquio. Portadores heterozigotos da doença de Tay-Sachs podem ter inclusões linfocíticas [178], mas em porcentagem bem mais baixa de linfócitos do que os homozigotos. As inclusões de Alder-Reilly são redondas ou em formato de vírgula; às vezes, são circundadas por um halo e tendem a agrupar-se em um polo da célula (ver Figura 3.124a). Quando a anomalia de Alder-Reilly é devida a uma das mucopolissacaridoses, as inclusões coram-se de modo metacromático com o azul-de-toluidina (ver Figura 3.124b); isso não ocorre quando a causa subjacente é a doença de Tay-Sachs. Na gangliosidose GM, pode haver inclusões linfocíticas anormais (Figura 3.125).

Vacuolização dos linfócitos ocorre em vários distúrbios metabólicos hereditários, incluindo doença da célula-I (Figura 3.126), sialidose (mucopolidose tipo I), mucopolissacaridoses, anomalia de Jordan, doença de Niemann-Pick tipo A, doença de Wolman, doença de armazenamento de éster de colesterol, gangliosidose GM1 (vacúolos pequenos na

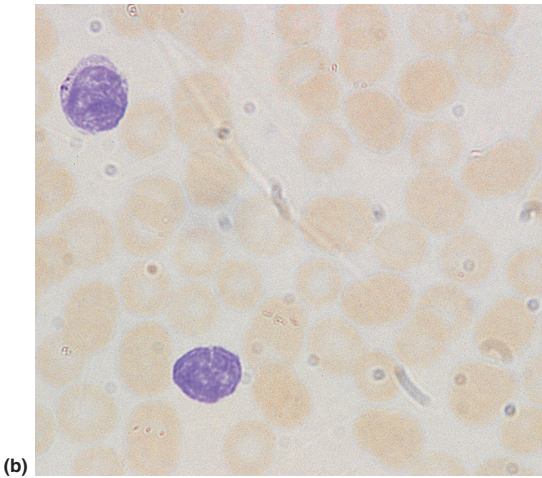
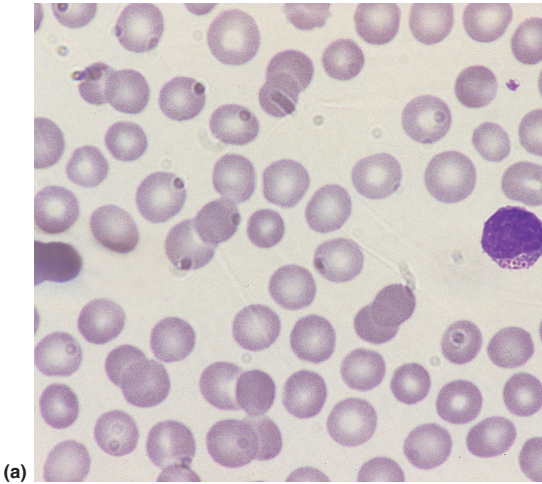


FIGURA 3.124 Distensão de sangue de paciente com síndrome de Sanfilippo, mostrando (a) inclusões linfocíticas circundadas por um halo e (b) distensão sanguínea do mesmo paciente, corada com azul-de-toluidina para exibir a coloração metacromática das inclusões. Cortesia do Sr. Alan Dean.

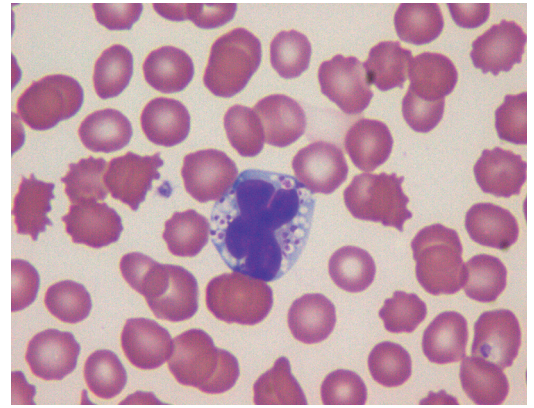


FIGURA 3.125 Linfócito em distensão de sangue periférico em gangliosidose GM1 (deficiência de β -galactosidase), mostrando vacúolos contendo material granular anormal. Cortesia do Dr. Jiří Pavůl.

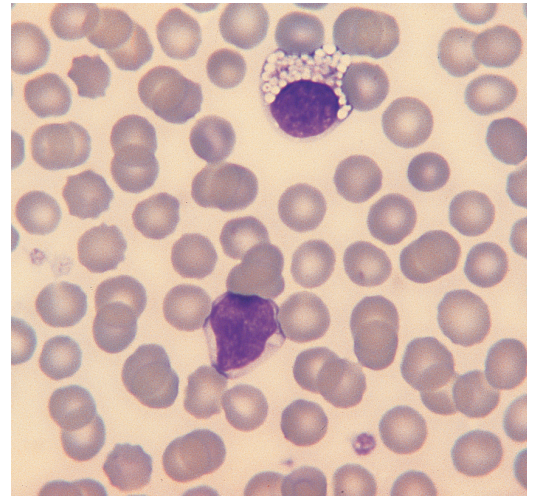


FIGURA 3.126 Distensão de sangue de criança com a doença da célula-I. Um dos linfócitos mostra intensa vacuolização citoplasmática.

doença infantil tardia – tipo 2 – e vacúolos maiores na doença infantil – tipo 1) (ver Figura 3.14), mannosidose, doença de Pompe, doença de Tay-Sachs, doença de Batten infantil (mas não os demais tipos), galactosidemia (ver Figura 3.143), galactossialidose, doença de armazenamento de ácido siálico e vários outros distúrbios congênitos raros do metabolismo [75, 258-264] (Tabela 3.11). Nas doenças de Tay-Sachs e de Batten-Spielmeyer-Vogt, os portadores heterozigotos também podem apresentar vacuolização linfocítica. O produto metabólico responsável pela vacuolização varia: pode ser lipídio,

glicogênio ou mucopolissacarídeo. Nas mucopolissacaridoses, os vacúolos podem resultar da dissolução dos grânulos anormais; há uma coloração metacromática variável com azul-de-toluidina, dependendo do defeito metabólico específico presente.

Alterações reacionais dos linfócitos

Os linfócitos podem responder a infecções virais e outros estímulos imunológicos com aumento numérico e alterações citológicas. Linfócitos B podem diferenciar-se em plasmócitos (Figura 3.127); também são vistos estágios intermediários da

TABELA 3.11 Características dos vacúolos do linfócito e outros aspectos do sangue periférico nos distúrbios metabólicos hereditários (informações derivadas principalmente da referência 264)

Distúrbio metabólico hereditário	Características dos vacúolos e outros aspectos hematológicos
Doença de Pompe (doença de armazenamento de glicogênio tipo 2)	1-6 vacúolos PAS-positivos, pequenos, distintos
Deficiência no adulto de maltase ácida	1-6 vacúolos PAS-positivos, pequenos, distintos, mas menos frequentes do que na doença de Pompe
Doença de Salla (doença de armazenamento de ácido siálico)	Numerosos vacúolos pequenos
Sialidose tipo 2 (deficiência de neuraminidase)	Numerosos vacúolos grandes e conspícuos
Deficiência de neuraminidase e α -galactosidase (galactossialidose)	Numerosos vacúolos grandes e conspícuos
Doença da célula-I (mucopolipidose II)	Numerosos vacúolos grandes e conspícuos, referidos como PAS e Sudan-black B positivos em um paciente e negativos em outro [263]
Gangliosidose GM1 (deficiência de β -galactosidase)	Numerosos vacúolos grandes e conspícuos; grânulos eosinófilos são grandes, cinzentos e dispersos
Mucopolissacaridose 1H (síndrome de Hurler); mucopolissacaridose 1S (síndrome de Scheie); mucopolissacaridose 1HS (síndrome de Hurler/Scheie)	Vacúolos ocasionais em alguns linfócitos, alguns com inclusões basófilas; inclusões metacromáticas com azul-de-toluidina em < 5% dos linfócitos
Mucopolissacaridose 2 (síndrome de Hunter)	Vacúolos ocasionais em alguns linfócitos; anel róseo ao redor dos vacúolos citoplasmáticos [262]; inclusões metacromáticas com azul-de-toluidina em <20% dos linfócitos
Mucopolissacaridose 3 (síndrome de Sanfilippo)	Vacúolos ocasionais em alguns linfócitos; inclusões metacromáticas com azul-de-toluidina em >20% dos linfócitos
Mucopolissacaridose 4 (síndrome de Morquio), tipo A	Sem vacúolos, sem metacromasia
Mucopolissacaridose 4 (síndrome de Morquio), tipo B	Pequenos vacúolos em muitos linfócitos, sem metacromasia
Mucopolissacaridose 6 (síndrome de Maroteaux-Lamy)	Pequenos vacúolos em muitos linfócitos; inclusões metacromáticas com azul-de-toluidina em linfócitos, anomalia de Alder-Reilly dos neutrófilos (grânulos basófilos, metacromáticos, birrefringentes)
Mucopolissacaridose 7 (deficiência de β -glicuronidase)	Pequenos vacúolos em alguns linfócitos; anomalia de Alder-Reilly dos neutrófilos (grânulos basófilos, metacromáticos, birrefringentes)
Doença de Niemann-Pick	1-6 pequenos vacúolos na maioria dos linfócitos
Fucosidose	Vacúolos pequenos e distintos nos linfócitos
Doença de Batten infantil	Numerosos vacúolos grandes e conspícuos em muitos linfócitos
Manosidose	Vacúolos variáveis, de numerosos e pequenos a poucos e grandes
Doença de Wolman	1-6 vacúolos pequenos e distintos na maioria dos linfócitos; coram-se com vermelho-óleo O e Sudan-black B
Doença de armazenamento de éster de colesterol	Vacúolos coram-se com vermelho-óleo O e Sudan-black B

PAS, coloração ácido periódico de Schiff.

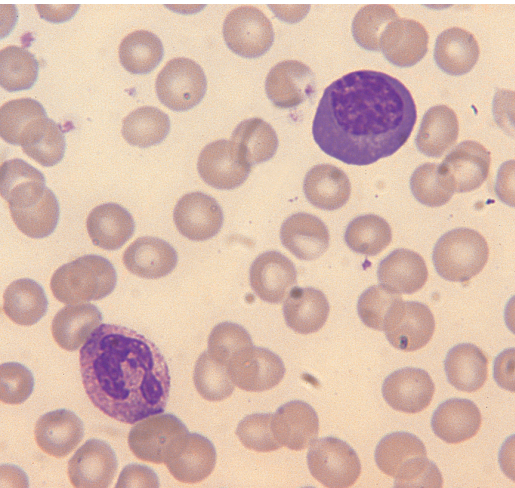


FIGURA 3.127 Distensão sanguínea de paciente em pós-operatório, mostrando um plasmócito e um neutrófilo com granulação tóxica e um *drumstick*.

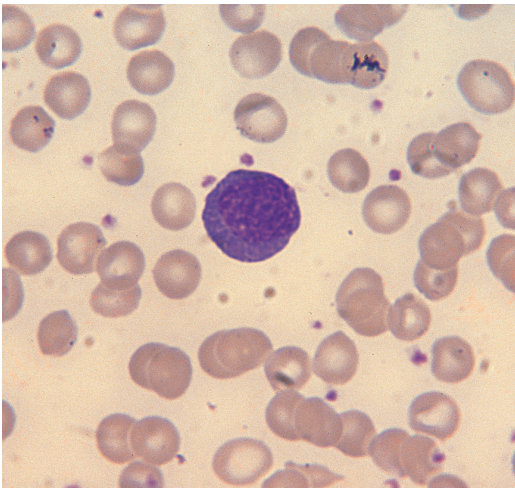


FIGURA 3.128 Linfócito plasmocitoide na mesma distensão sanguínea da Figura 3.127.

transformação e são denominados linfócitos plasmocitoides (Figura 3.128) ou células de Türk. Linfócitos plasmocitoides podem conter inclusões globulares numerosas (Figura 3.129), compostas por imunoglobulina. Essas células são chamadas de “células de Mott”, “células morulares” ou “células em cacho de uva” e as inclusões contidas, corpos de Russell. Linfócitos plasmocitoides também podem conter cristais de imunoglobulina (Figuras 3.130 e 3.131). Tanto linfócitos T quanto B podem transformar-se em imunoblastos, células grandes, com nucléolo central proeminente e citoplasma basófilo abundante (Figura 3.132). Linfócitos que mostram outras alterações morfológicas menos específicas costumam ser agrupados sob a designação de “linfócitos atípicos” (Figura 3.133). As anormalidades incluem tamanho celular aumentado, imaturidade do núcleo, incluindo falta de condensação da cromatina e presença de nucléolo, contorno nuclear irregular ou lobulação, basofilia citoplasmática, vacuolização citoplasmática, grânulos citoplasmáticos e contorno celular irregular; podem ser vistas figuras mitóticas (Figura 3.134). A causa mais comum do aparecimento de um grande número de linfócitos atípicos é a mononucleose infecciosa devida a infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), discutida no Capítulo 9 juntamente com as demais causas. Linfócitos com núcleo clivado podem ser vistos na coqueluche e na infecção pelo vírus sincicial respiratório. Linfócitos com núcleo multilobado, em formato de trevo, são característicos da leucemia/linfoma T do adulto (LLTA; ver Capítulo 9), mas também podem ser vistos nos portadores do vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1), na

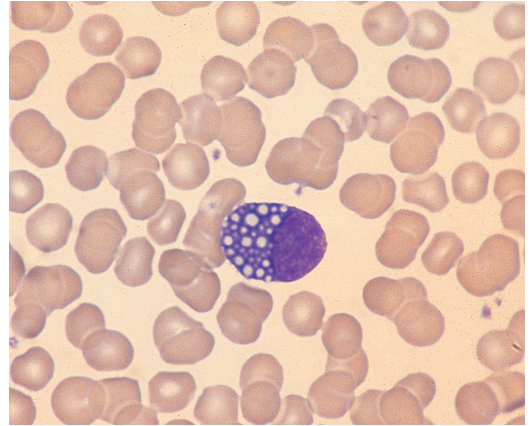


FIGURA 3.129 Célula de Mott em distensão de sangue periférico.

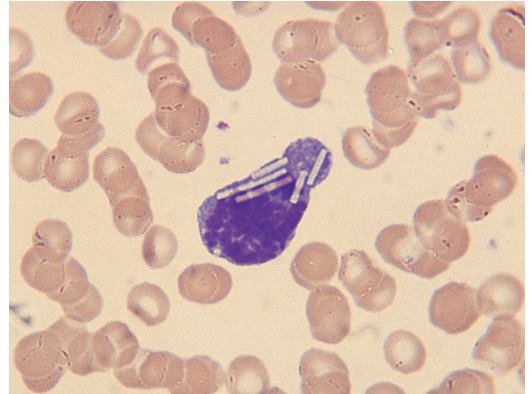


FIGURA 3.130 Linfócito plasmocitoide contendo cristais em distensão de sangue periférico de um paciente com sepse bacteriana.

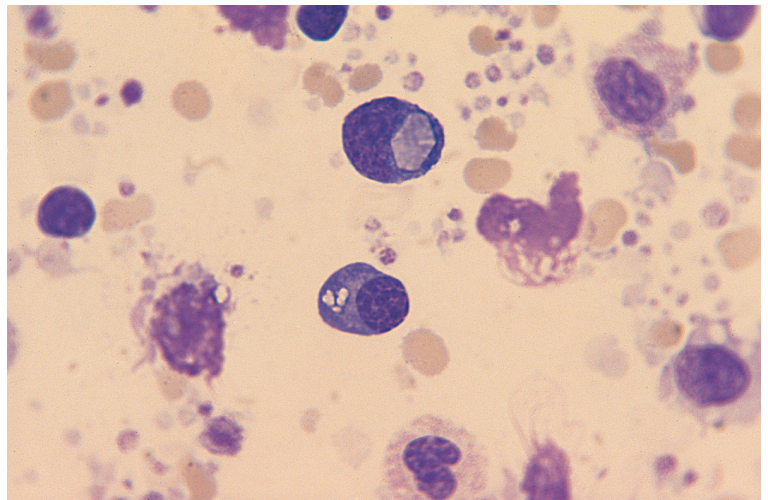


FIGURA 3.131 Distensão da camada de leucócitos (*buffy coat*) obtida do mesmo paciente cuja distensão de sangue aparece na Figura 3.130 mostrando um linfócito plasmocitoide contendo inclusões globoides e outro com um cristal gigante.

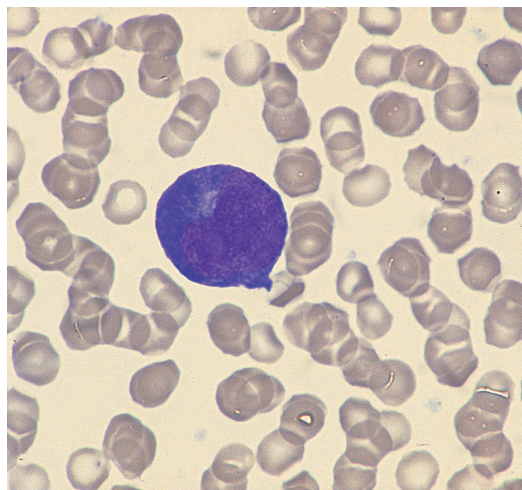


FIGURA 3.132 Imunoblasto em distensão de sangue periférico de um paciente com mononucleose infecciosa.

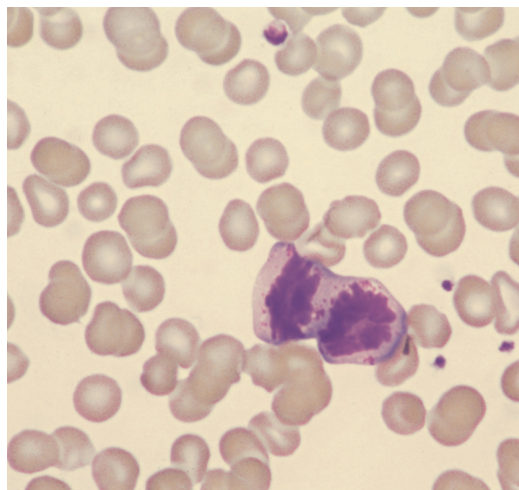


FIGURA 3.134 Linfócito em mitose no sangue periférico.

mononucleose infecciosa, nas infecções por HIV, citomegalovírus (CMV) e riquétsia e na toxoplasmose [265, 266]. Linfócitos com núcleos convolutos, semelhantes ao das células de Sézary, podem ocorrer em condições reacionais, inclusive infecção pelo HIV [267] e foram descritos, juntamente com infiltração cutânea, como reação inusitada à leucemia de células pilosas [268]. Lobulação nuclear anormal pode ser induzida por hipertermia [188]. Inclusões similares a corpos de Howell-Jolly, provavelmente induzidas por fármaco, foram descritas em um paciente [254]. Linfócitos semelhantes aos do linfoma

esplênico com linfócitos vilosos podem aparecer na esplenomegalia hiper-reativa da malária [269]. Foram descritos linfócitos binucleados após irradiação em dose baixa e linfócitos binucleados e com núcleos bilobulados na linfocitose de células B policlonais de tabagistas (Figura 3.135). Linfócitos binucleados são induzidos pelo uso de natalizumabe [270]. O número de linfócitos grandes e granulados também pode aumentar como um fenômeno reacional, por exemplo, em infecções virais crônicas, como as infecções por EBV [271] e CMV [272] ou a hepatite.

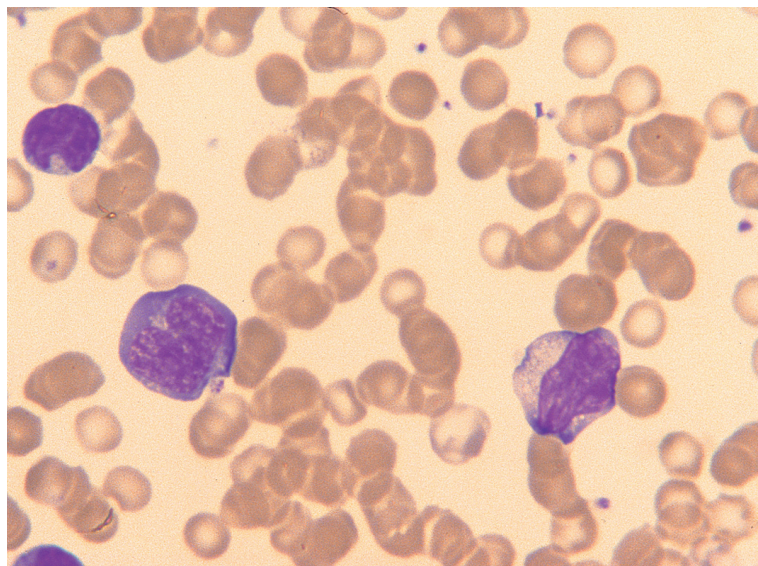


FIGURA 3.133 Linfócitos atípicos em distensão de sangue periférico de um paciente com infecção por citomegalovírus.

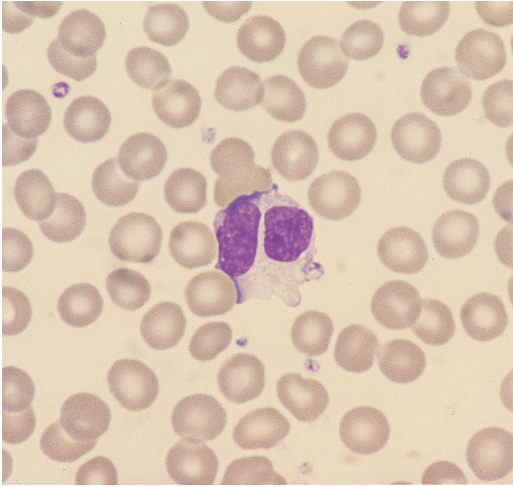


FIGURA 3.135 Linfócito binucleado em distensão de sangue periférico de mulher tabagista com linfocitose policlonal de células B.

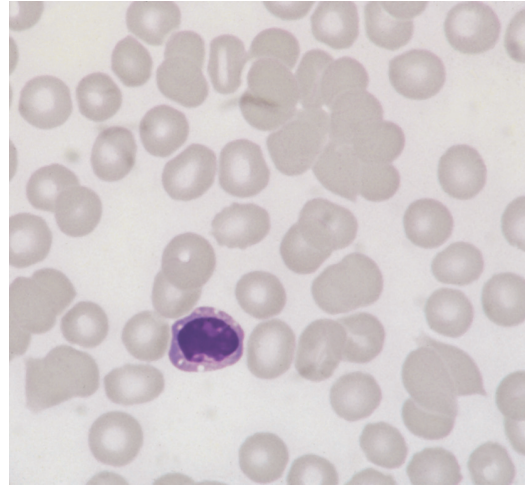


FIGURA 3.136 Linfócito apoptótico no sangue de paciente com mononucleose infecciosa. Há, também, aglutinação dos eritrócitos.

Linfócitos apoptóticos

Um número aumentado de linfócitos apoptóticos pode estar presente em condições reacionais, particularmente infecções virais, incluindo mononucleose infecciosa, herpes simples neonatal, rubéola, sarampo e influenza A [244]. Também estão aumentados, e correlacionam-se com a gravidade, na doença meningocócica invasiva [244]. São reconhecidos pela condensação periférica do núcleo e por um aspecto vítreo do citoplasma (Figura 3.136).

Morfologia dos linfócitos nos distúrbios linfoproliferativos

Na maioria dos distúrbios linfoproliferativos, as células neoplásicas são citologicamente anormais. As anormalidades sobrepõem-se, até certo ponto, às encontradas nas condições reacionais, mas a maioria das neoplasias linfóides pode ser reconhecida como tal apenas pela citologia. Inclusões citoplasmáticas às vezes estão presentes; linfócitos na leucemia linfocítica crônica podem conter vacúolos ou inclusões cristalinas ou globosas

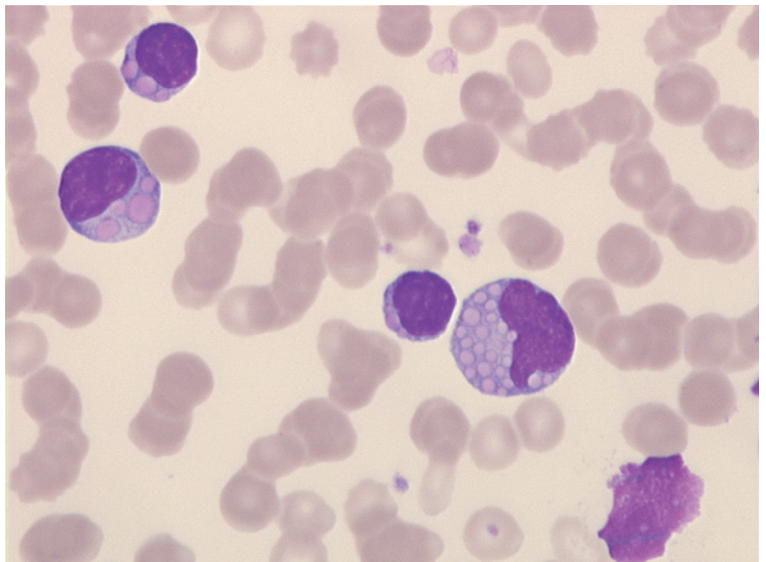


FIGURA 3.137 Distensão sanguínea de leucemia linfocítica crônica, mostrando inclusões citoplasmáticas globosas; nota-se também uma célula amasada (resto nuclear de Gumprecht). Cortesia do Dr. Jan Haskta e da Prof.^a Georga Metzgeroth, Mannheim.

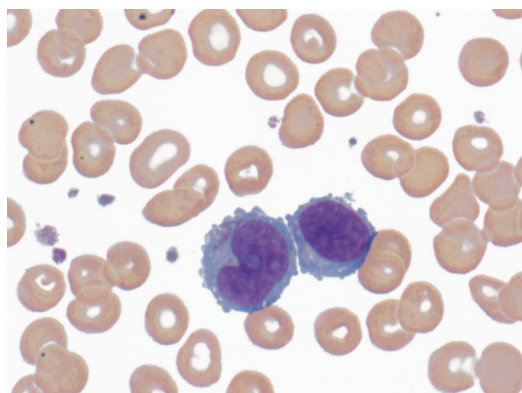


FIGURA 3.138. Distensão sanguínea de linfoma não Hodgkin, mostrando inclusões semelhantes a bastões de Auer. Cortesia de Lyndall Dial, Brisbane.

(Figura 3.137). Raramente, pode ser visto à microscopia óptica um complexo ribossômico-lamelar na leucemia de células pilosas. Em linfoma não Hodgkin, também raramente, há inclusões semelhantes a bastões de Auer (Figura 3.138). Inclusões redondas ou em bastonete, representando arranjos tubulares paralelos, foram descritos em um paciente com leucemia de linfócitos T grandes e granulares [273].

Aspectos típicos de cada uma das neoplasias linfoides estão descritos no Capítulo 9.

Agregados de linfócitos

Linfócitos aparentemente normais às vezes aparecem em distensões sanguíneas formando agregados (Figura 3.139) [274]. Embora incomum, a presença

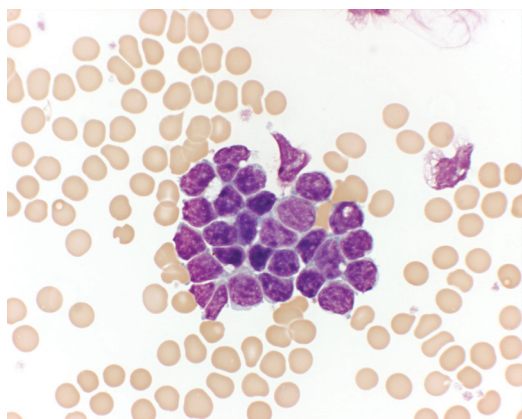


FIGURA 3.139 Agregação de linfócitos de significado obscuro (pequeno aumento); não havia evidência de distúrbio clonal. Agradecimentos aos Drs. Jecko Thachil e Anthony Carter, Liverpool.

de agregados também é um aspecto dos distúrbios linfoproliferativos: pode representar um fenômeno *in vitro* [275], mas, ainda mais raramente, é indicativa da presença de linfoma intravascular [276]. Como um artefato *in vitro*, o fenômeno correlaciona-se particularmente com o linfoma esplênico com linfócitos vilosos (linfoma esplênico da zona marginal) [275, 277], mas também tem sido notado no linfoma de células do manto [278].

O plasmócito (célula plasmática)

Os plasmócitos em geral são células teciduais, mas, algumas vezes, aparecem no sangue periférico, como um aspecto do mieloma múltiplo ou como um fenômeno reacional (ver Figuras 3.64 e 3.127). Não costumam ser vistos em pessoas saudáveis [279]. Plasmócitos reacionais surgem no sangue como resposta a aumento de secreção de interleuquina 6 em infecção, inflamação e após vacinação, em cirrose e várias neoplasias, como LMA, carcinoma, linfoma e mixoma cardíaco [280, 281]. Ocasionalmente podem ocorrer plasmocitoses reacionais muito intensas, simulando leucemia plasmocítica; casos desses foram descritos durante tratamento com estreptocinase, na doença de Castleman, em sepse bacteriana [282], na rubéola, na dengue [283] e no linfoma angioblástico de células T [284].

Plasmócitos variam em tamanho de um pouco maiores do que o linfócito pequeno (8-10 µm) até um diâmetro em torno de 20 µm; têm formato oval, núcleo excêntrico, cromatina grosseiramente aglomerada, quantidade moderada de citoplasma intensamente basófilo e uma zona de Golgi mais clara, adjacente ao núcleo. O padrão da cromatina (semelhante a um mostrador de relógio ou roda de carroça), que é visto nos cortes teciduais corados com hematoxilina e eosina, é menos aparente nos plasmócitos circulantes corados com corantes de Romanowsky. Plasmócitos podem conter produtos secretórios que aparecem como inclusões redondas ou globosas, raramente como cristais.

Plasmócitos originados de distúrbios neoplásicos (mieloma múltiplo, leucemia plasmocítica e condições relacionadas) às vezes são vistos no sangue periférico. Em todas essas condições, há uma variação ampla de anormalidades citológicas.

Células da linhagem monocítica

O monócito

O monócito (Figura 3.140) é a maior célula normal do sangue periférico, com diâmetro de 12-20

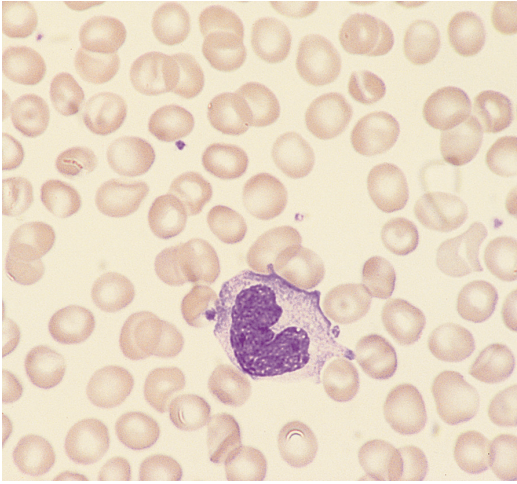


FIGURA 3.140 Monócito normal em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio.

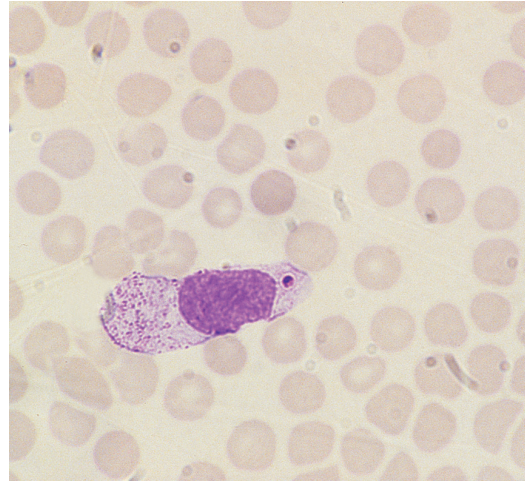


FIGURA 3.141 Distensão sanguínea de paciente com síndrome de Maroteaux-Lamy, mostrando um monócito com uma inclusão citoplasmática anormal. Cortesia do Sr. Alan Dean.

µm. Apresenta um núcleo irregular, geralmente lobulado, e citoplasma cinza-azulado opaco, com grânulos azurófilos finos. O contorno celular é irregular, e o citoplasma pode ser vacuolizado. Pode-se notar a cromatina sexual condensada sob a membrana nuclear [151].

Monócitos produzidos sob condições de estímulo à medula óssea, como infecção ou recuperação de uma supressão da hematopoese, mostram aumento da relação núcleo-citoplasmática, padrão mais delicado da cromatina, nucléolos, e aumento do número de vacúolos [145]. A basofilia citoplasmática e a granulação azurófila também podem aumentar. A administração de G-CSF produz alterações citológicas similares [145]. Lobulação nuclear anormal pode ser induzida por hipertermia [188]. Inclusões similares a corpos de Howell-Jolly, provavelmente induzidas por fármacos, foram descritas em um paciente [254].

Monócitos podem conter inclusões anormais em várias condições hereditárias (Figura 3.141 e 3.142; ver também Tabela 3.10). Em algumas doenças metabólicas, podem ser muito vacuolizados (Figura 3.143). Como são fagócitos, às vezes contêm eritrócitos ingeridos (Figura 3.144), crioglobulina (Figura 3.145), microrganismos, pigmento malárico (Figura 3.146) e, raramente, melanina [209] ou bilirrubina [210]. Eritrofagocitose por monócitos pode decorrer de anormalidades dos eritrócitos (como na anemia de células falciformes) ou da ligação de anticorpos ou complemento aos eritrócitos (como na hemoglobinúria paroxística noturna, na

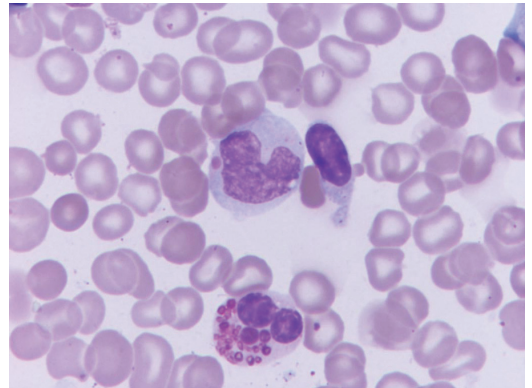


FIGURA 3.142 Um monócito contendo uma grande inclusão cor de tijolo na síndrome de Chédiak-Higashi. Há também um eosinófilo com grânulos gigantes, alguns mais escuros que os normais. Agradecimentos ao Dr. Abbas Abdulsalam, Bagdá.

anemia hemolítica autoimune ou na doença hemolítica anti-D do recém-nascido). Monócitos do sangue periférico, na malária, podem conter eritrócitos parasitados [285] e fagocitose de heme [286]. Na síndrome de Hermansky-Pudlak, podem conter inclusões ceroides [287].

Precursos dos monócitos

Os precursores dos monócitos, denominados promonócitos e monoblastos, não estão normalmente presentes no sangue periférico. Monoblastos são células muito grandes, com grande núcleo redondo

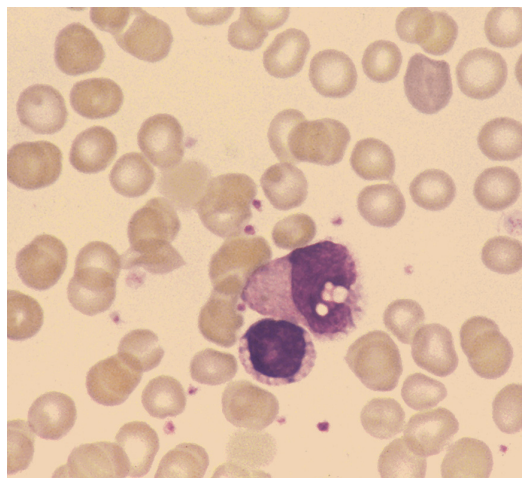


FIGURA 3.143 Um monócito anormalmente vacuolizado e um linfócito grosseiramente vacuolizado no sangue de paciente com galactosidemia. Cortesia do Dr. Guy Lucas.

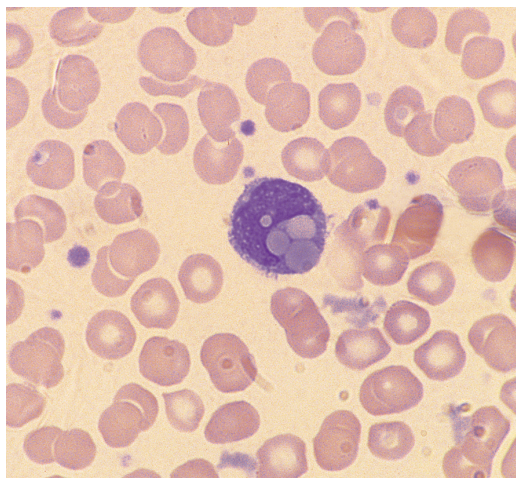


FIGURA 3.145 Distensão sanguínea de um paciente com crioglobulinemia, mostrando crioglobulina dentro de um monócito. Cortesia do Sr. Alan Dean.

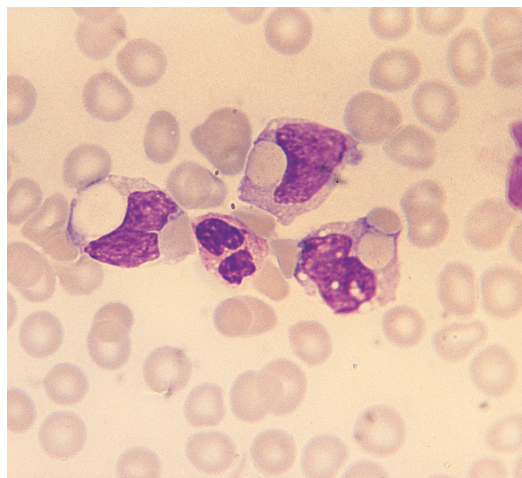


FIGURA 3.144 Distensão sanguínea de paciente com insuficiência renal crônica, durante hemodiálise, mostrando eritrócitos fagocitados por monócitos. O paciente tinha teste direto de antiglobulina positivo, mas sem hemólise manifesta.

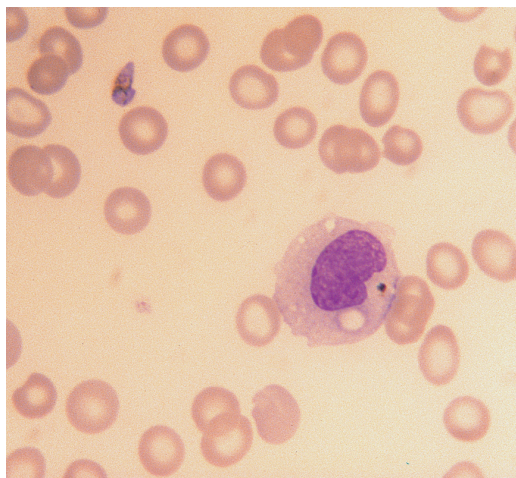


FIGURA 3.146 Distensão sanguínea de paciente com malária mostrando pigmento malárico no interior de um monócito. A distensão também apresenta um gametócito do *Plasmodium falciparum*.

e amplo citoplasma agranular ou com granulação tênue, às vezes vacuolizado (Figura 3.147); só são vistos no sangue em leucemias agudas com diferenciação monocítica. Promonócitos, conforme a definição Franco-Americano-Britânica (FAB) na classificação de neoplasias hematológicas da Organização Mundial da Saúde (OMS), são células muito primitivas (equivalentes em significação aos monoblastos), com um padrão cromatínico difuso, mas com lobulação ou outra irregularidade do núcleo.

Devem se distinguidos dos monócitos imaturos ou anormais, presentes no sangue em condições reacionais (ver anteriormente) e em neoplasias mieloides crônicas.

O macrófago

Os monócitos geralmente evoluem para macrófagos (também chamados de histiócitos) nos tecidos, e não na corrente sanguínea, mas, às vezes, são vistas células circulantes com características de

FIGURA 3.147 Distensão sanguínea de paciente com leucemia monocítica aguda, mostrando um monoblasto (à esquerda) e um promonócito (à direita). O promonócito tem núcleo lobulado mas com cromatina delicada como a do monoblasto; ambas as células têm citoplasma abundante, cinza-azulado e vacuolizado.

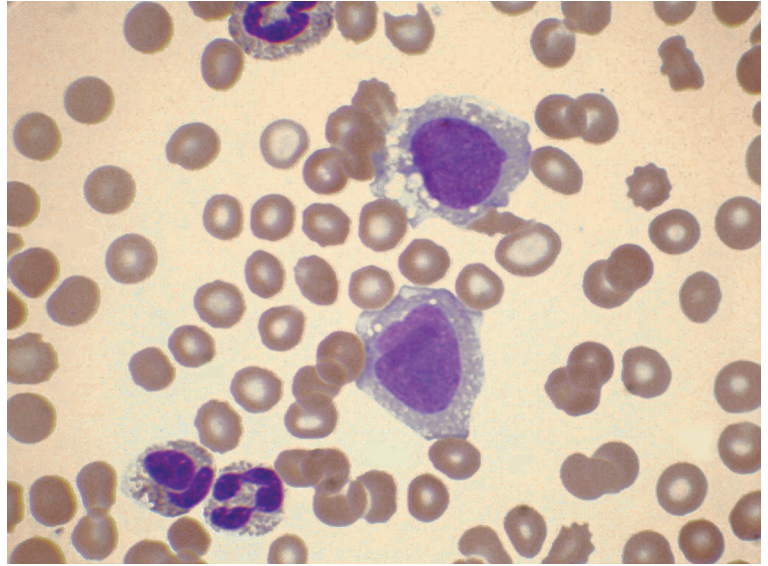
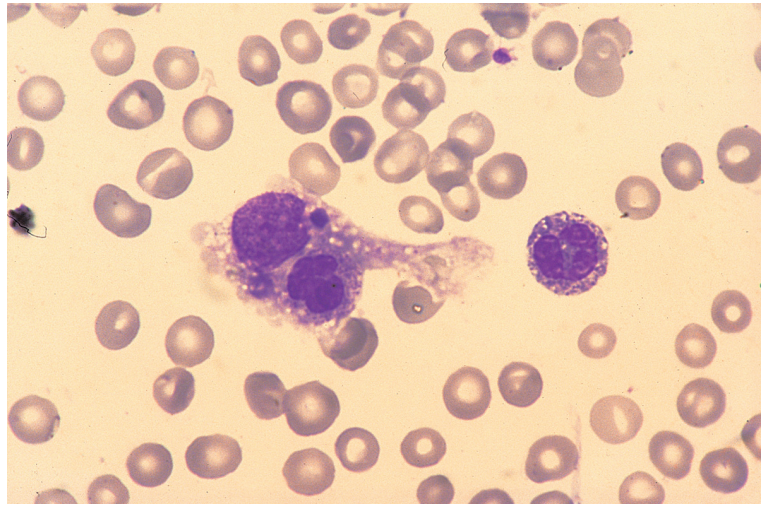


FIGURA 3.148 Macrófago fagocítico em distensão de sangue periférico. Cortesia do Dr. Z. Currimbhoy, Mumbai.



macrófagos [288] (Figura 3.148). Estão associadas a vários estados infecciosos e inflamatórios (como a endocardite bacteriana subaguda, a tuberculose, a febre tifoide [289] e a síndrome hemofagocítica associada a viroses [290]), a doenças malignas e a parasitoses. Podem ser um pouco maiores do que o monócito ou muito grandes e multinucleados [201]. O citoplasma pode conter células da hematopoese, fragmentos celulares ou restos amorfos. Em certos distúrbios metabólicos, aparecem, no sangue periférico, macrófagos espumosos contendo lipídios [259]. Fagócitos circulantes podem ser vistos, também, na histiocitose maligna e na leucemia monocítica aguda. Células de Gaucher foram notadas

muito raramente no sangue, após esplenectomia pela doença [291]. Células espumosas de linhagem monocítica/macrofágica podem ser vistas no sangue na doença de Niemann-Pick [291].

Precursos dos granulócitos

Granulócitos são produzidos na medula óssea a partir de mieloblastos, com estágios intermediários representados por promielócitos, mielócitos e metamielócitos; são só ocasionalmente encontrados no sangue. A presença de um apreciável número dessas células no sangue é designada desvio

à esquerda; se eritroblastos também estiverem presentes, o aspecto sanguíneo é descrito como leuco-eritroblástico. O aparecimento, no sangue periférico, de leucócitos em estágio de desenvolvimento anterior ao metamielócito é geralmente considerado anormal, a menos que se trate de sangue de gestante ou de recém-nascido. No entanto, quando são feitas preparações de concentrados de leucócitos do *buffy coat*, encontram-se metamielócitos e/ou mielócitos em 80% das pessoas normais, com uma frequência próxima a 1 em 1.000 granulócitos [292].

O mieloblasto

O mieloblasto mede 12-20 μm , tem uma relação nucleio-citoplasmática elevada e núcleo redondo ou ovalado (ver Figura 3.81). A célula é um pouco ovalada, e o contorno, levemente irregular. O núcleo apresenta um padrão de cromatina difuso e 1 a 5 (mais frequentemente 2 ou 3) nucléolos não muito proeminentes. O citoplasma é azul-pálido. O mieloblasto costuma ser definido como uma célula sem grânulos visíveis à microscopia óptica, embora o exame ultraestrutural e a citoquímica mostrem que, na verdade, ele contém grânulos. Está se tornando comum a inclusão na categoria de mieloblasto de células já com pequeno número de grânulos, mas sem as outras características dos promielócitos (ver a seguir), de acordo com as recomendações feitas pelo grupo FAB, concernentes ao diagnóstico da LMA [293], subsequentemente suportadas pela classificação da OMS. Embora o mieloblasto tenha aspectos citológicos característicos, nem sempre é possível distinguir um mieloblasto agranulado de um linfoblasto em difusão corada com MGG.

Blastos circulantes são raríssimos em pessoas saudáveis; em um estudo, foi contado, em média, 0,11% dentre as células mononucleares [279]. Um pequeno número de blastos pode surgir no sangue durante tratamento com natulizumabe, um inibidor da integrina [294]. Nas neoplasias hematológicas, os mieloblastos circulantes podem mostrar características citológicas anormais, como a presença de bastões de Auer (ver Figura 3.88) ou vacúolos citoplasmáticos. A presença de até mesmo um único blasto com bastão de Auer indica tratar-se de uma neoplasia mieloide.

O promielócito

O promielócito é redondo ou ovalado e maior do que o mieloblasto, com um diâmetro de 15 a 25 μm (Figura 3.149). Ao compará-lo com o mieloblasto, verifica-se que a relação nucleio-citoplasmática é menor, e o citoplasma, mais basófilo. A cromatina

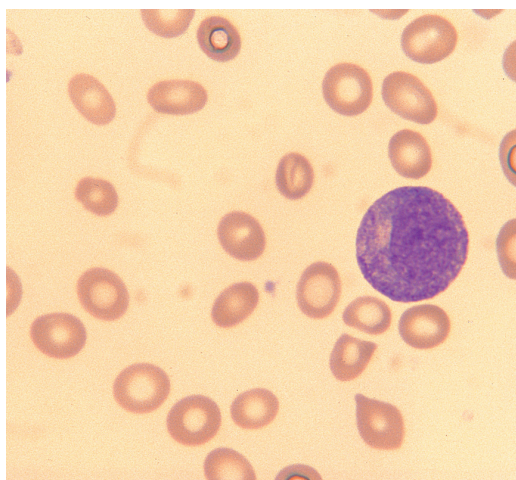


FIGURA 3.149 Promielócito no sangue periférico de paciente com anemia megaloblástica. O nucléolo e a zona de Golgi são facilmente notados. Há também anisocitose e picilócitos em formato de lágrima.

nuclear mostra apenas ligeira condensação e os nucléolos são evidentes. (A cromatina condensada em grumos densos, chamada de heterocromatina, é geneticamente inativa, ao passo que a eucromatina difusa é geneticamente ativa; a maturação celular está associada à condensação progressiva da cromatina.) O núcleo do promielócito é oval, com indentação em um lado. A zona de Golgi é evidenciada como uma área clara adjacente à indentação nuclear. O promielócito contém grânulos primários, ou azurófilos, que circundam a zona de Golgi e dispersam-se no resto do citoplasma.

Promielócitos morfológicamente anormais são vistos no sangue periférico em vários subtipos de LMA (ver Capítulo 9).

O mielócito

O mielócito é menor do que o promielócito, com diâmetro de 10-20 μm . É identificado como pertencente à linhagem neutrófila, eosinófila ou basófila pela presença de grânulos específicos ou secundários, com as características tintoriais próprias de cada linhagem (Figuras 3.150 a 3.152). Mielócitos eosinófilos podem ter alguns grânulos pró-eosinofílicos, com características tintoriais basófilas. O núcleo do mielócito é oval e pode ter pequena indentação. A cromatina mostra grau moderado de condensação e nucléolos não são aparentes. O citoplasma é mais acidófilo do que o do promielócito, com a zona de Golgi muito menos evidente. Mielócitos neutrófilos e eosinófilos podem aparecer no sangue em condições reacionais e em leucemias. O achado de

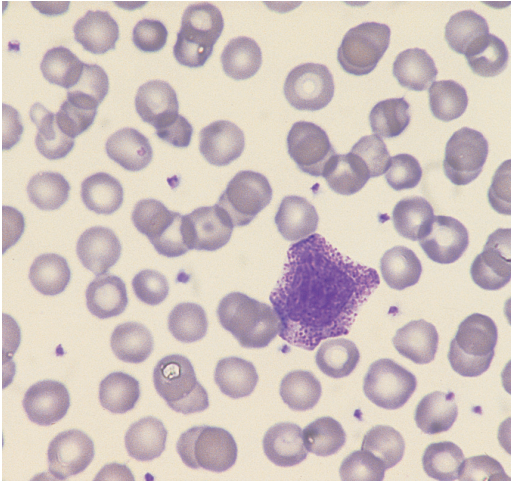


FIGURA 3.150 Mielócito neutrófilo em distensão de sangue de gestante sadia.

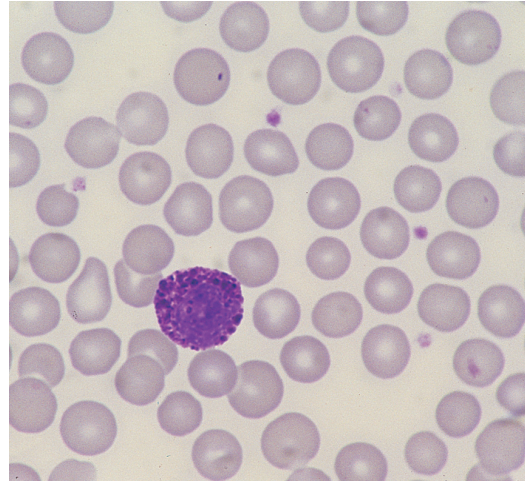


FIGURA 3.152 Mielócito basófilo em distensão de sangue de paciente com leucemia mieloide crônica.

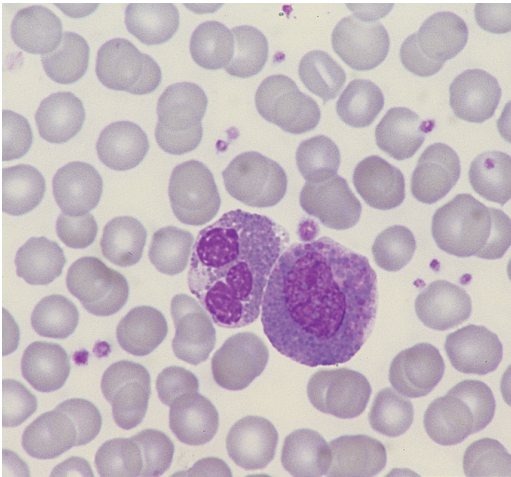


FIGURA 3.151 Um eosinófilo e um mielócito eosinófilo em distensão de sangue de paciente com leucemia mieloide crônica.

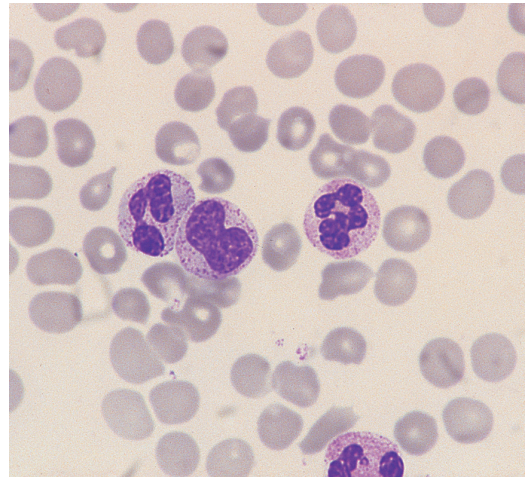


FIGURA 3.153 Um metamielócito e dois neutrófilos em distensão de sangue de paciente com leucemia mieloide crônica.

mielócitos basófilos no sangue periférico limita-se essencialmente às leucemias. Em leucemias agudas, os mielócitos circulantes podem mostrar alterações morfológicas como hipogranularidade ou grânulos excepcionalmente grandes.

O metamielócito

O metamielócito mede de 10-12 μm de diâmetro. A cromatina dispõe-se em grumos; o núcleo é bem indentedo ou em formato de U (Figura 3.153). Não mais sintetiza proteínas. O metamielócito neutrófilo tem citoplasma acidófilo, enquanto o do metamielócito eosinófilo é levemente basófilo.

Metamielócitos neutrófilos são vistos, às vezes, em pequeno número, no sangue normal. Estão comumente presentes em condições reacionais. Alguns metamielócitos eosinófilos podem ser vistos em pacientes com eosinofilia.

O quadro leucoeritroblástico

Fala-se em quadro leucoeritroblástico (ou reação leucoeritroblástica) quando a distensão sanguínea mostra a presença de eritroblastos e precursores granulocíticos. O aspecto é normal no feto até

28 semanas de gestação e pode ser visto em etapa tardia da gestação e no período pós-parto. Em outras circunstâncias, um quadro leucoeritroblástico é anormal: pode ser reacional, surgindo após trauma, choque ou perda súbita de sangue, ou indicativo de doença da medula óssea. Uma distensão sanguínea com reação leucoeritroblástica é particularmente característica da mielofibrose primária ou de infiltração da medula óssea. Nas primeiras 24 horas de vida extrauterina, um quadro leucoeritroblástico pode decorrer de seps/corioamnionite materna, asfixia severa ao nascimento ou síndrome de Down [85].

O mastócito

Mastócitos são essencialmente células teciduais, extremamente raras no sangue periférico de pessoas normais. São células grandes, com um diâmetro de 20-30 μm . O contorno celular é irregular e o citoplasma é cheio de grânulos basófilos que não escondem o núcleo central (Figura 3.154). O núcleo é relativamente pequeno e redondo, ou oval, com a cromatina esparsa. Na mastocitose sistêmica e na leucemia mastocítica (ver Capítulo 9), os mastócitos circulantes são citologicamente muito anormais; podem ter núcleos lobulados, grânulos escassos ou um padrão cromatínico mais denso.

Células desintegradas

O achado na distensão sanguínea de mais do que raras células desintegradas é significativo, pois pode

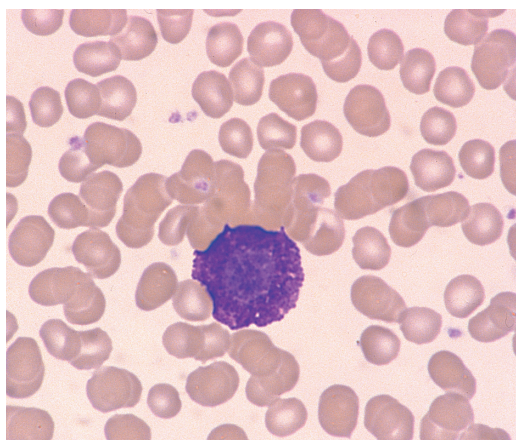


FIGURA 3.154 Mastócito em distensão de sangue periférico de paciente submetido a exame médico por sintomas inespecíficos.

indicar que o sangue foi retirado do paciente há dias e que a amostra é inadequada para exame. Quando a desintegração das células decorre de estocagem prolongada, as células que mais se destroem são os granulócitos; a contagem diferencial mostrará uma neutropenia espúria.

Se a desintegração de células ocorrer em distensões de sangue recentemente coletado, isso indicará que as células são excessivamente frágeis. Linfócitos desintegrados, chamados de *smear cells*, *smudge cells*, ou restos nucleares de Gumprecht, são comuns na LLC (Figura 3.155). A presença tem certa utilidade diagnóstica, uma vez que são incomuns nos linfomas leucêmicos, dos quais a LLC deve ser diferenciada. As células desintegradas constituem um

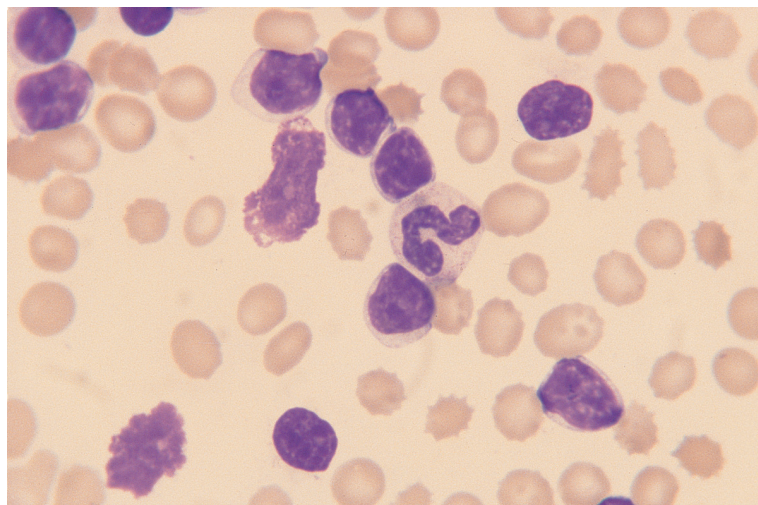


FIGURA 3.155 Linfócitos intactos e alguns desintegrados (*smudge cells*) na distensão de sangue de paciente com leucemia linfocítica crônica.

artefato de distensão, já que não existem *in vivo* e não são vistas em lâminas do mesmo sangue preparadas por centrifugação. Embora sejam características da LLC, não são patognômicas; são vistas, ocasionalmente, nos linfomas não Hodgkin e mesmo em linfocitoses reacionais, como na coqueluche. Células desintegradas podem resultar de efeito de quimioterapia sobre células linfoides neoplásicas [295]. Outras células anormais, como os blastos da LMA, também podem desintegrar-se por amassamento durante a distensão do sangue. Uma célula amassada, muito grande e distendida, tem sido denominada “célula em cesta” (*basket cell*). Quando há número significativo de células desintegradas, elas devem ser incluídas na contagem leucocitária diferencial. Quando as células originais são conhecidas, como na LLC, devem ser incluídas na contagem das células intactas do mesmo tipo.

Células necróticas da medula óssea

Células necróticas da medula óssea foram observadas em uma amostra de sangue venoso em um paciente com anemia de células falciformes em crise [296].

Plaquetas e megacariócitos circulantes

Ao examinar-se uma distensão sanguínea, deve-se estimar o número de plaquetas (relacionando-as com o número de eritrócitos no campo visual), seu tamanho e sua morfologia. Deve-se percorrer a lâmina à procura de agregação, satelitismo plaquetário ou fagocitose de plaquetas. Megacariócitos são vistos, embora raramente, no sangue de indivíduos saudáveis; o número aumenta em certos estados mórbidos.

Plaquetas

Plaquetas normais têm diâmetro de 1,5 a 3,0 μm . Contêm finos grânulos azurófilos, dispersos no citoplasma ou concentrados no centro; no último caso, a parte central do citoplasma, onde se encontram os grânulos, é chamada de granulômero, e a periférica, agranular e debilmente basófila, hialômero (ver Figura 3.16). As plaquetas contêm vários tipos de grânulos; os α -grânulos são os equivalentes dos grânulos azurófilos vistos à microscopia óptica. Ocasionalmente, são vistas proplaquetas no sangue periférico; são faixas, ou filamentos, de citoplasma de megacariócitos que se romperam em

sinusoides da medula óssea antes da fragmentação final em plaquetas.

Em sangue anticoagulado com EDTA, as plaquetas geralmente permanecem separadas umas das outras; em sangue nativo, mostram uma tendência a agregar-se (ver Figuras 1.6 a 1.8). Na trombastenia de Glanzmann, um grave defeito hereditário da agregação plaquetária, a tendência à agregação está ausente até mesmo em sangue nativo.

Anormalidades do tamanho das plaquetas

O tamanho das plaquetas pode ser avaliado ao microscópio comparando-se o diâmetro destas com o de eritrócitos. Além disso, o diâmetro das plaquetas pode ser medido por meio de um micrômetro ocular.

Em indivíduos saudáveis, o tamanho das plaquetas varia inversamente à contagem plaquetária, mas essa variação não é suficientemente grande para ser detectada pelo exame à microscopia óptica. Em certas anormalidades congênitas da trombopoese e em certos estados mórbidos (Tabela 3.12), o aumento de tamanho é suficientemente grande para ser detectado à microscopia. Plaquetas grandes, com diâmetro acima de 4 μm , são chamadas de macroplaquetas (ou macrotrombócitos); plaquetas excepcionalmente grandes, com diâmetro próximo aos de eritrócitos ou linfócitos, são denominadas plaquetas gigantes (Figura 3.156). Quando a renovação (*turnover*) plaquetária está acelerada, o volume plaquetário médio costuma estar aumentado. Consequentemente, a ausência de plaquetas grandes em pacientes com trombocitopenia tem importância diagnóstica: sugere haver um defeito da produção plaquetária. A redução do tamanho das plaquetas é muito mais rara do que o aumento; é uma das características da rara síndrome de Wiskott-Aldrich (Figura 3.157). Raramente, as plaquetas sofrem de granulação e incham no sangue anticoagulado com EDTA, mostrando-se grandes e hipogranulares na distensão sanguínea [303].

Outras anormalidades da morfologia e da distribuição das plaquetas, incluindo agregação e satelitismo

As plaquetas que não possuem α -grânulos apresentam-se cinzentas ou azul-pálidas. Isso ocorre em um raro defeito congênito, conhecido como síndrome das plaquetas cinzentas, que pode decorrer de deficiência apenas dos α -grânulos [302] ou de deficiência dupla, de α -grânulos e β -grânulos [304]. Pode haver uma mistura de plaquetas normais e

TABELA 3.12 Algumas causas de plaquetas grandes

Congênitas	Herança
Síndrome de Bernard-Soulier* [297]	AR
Portadores heterozigotos da síndrome de Bernard-Soulier* [124, 297]	AD
Estomatocitose mediterrânea/macrotrombocitopenia (fitosterolemia)	AR
Distúrbios relacionados a MYH9: anomalia de May-Hegglin,* síndrome de Epstein (associada a surdez e nefrite)* [230, 298], síndrome de Fechtner* [299], síndrome de Sebastian* [299]	AD
Anomalia de Chédiak-Higashi*	AR
Associada ao aumento de projeções nucleares nos neutrófilos [165]	AD
Síndrome de Marfan e outros defeitos hereditários do tecido conectivo (em famílias ocasionais) [300]	
Doença de von Willebrand tipo IIb*(e síndrome de plaquetas Montreal* [299], que agora demonstrou-se representar a mesma condição [301])	AD
Síndrome de von Willebrand tipo plaquetário* [299]	AD
Síndrome das plaquetas cinzentas* [302]	AR
Trombocitopenia hereditária com plaquetas gigantes, mas sem outra alteração morfológica ou doença associada*	AR ou AD
Adquiridas	
Púrpura trombocitopênica autoimune, primária e secundária*	
Púrpura trombocitopênica trombótica*	
Coagulação intravascular disseminada*	
Neoplasias mieloproliferativas: policitemia vera, leucemia mieloide crônica (fase crônica ou em transformação),* mielofibrose primária,* trombocitemia essencial	
Síndromes mielodisplásicas* e neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas	
Leucemia megacarioblástica*	
Pós-esplenectomia e estados hipoesplênicos (incluindo a anemia de células falciformes)	

*Pode haver também trombocitopenia.
AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva.

anormais. Em algumas famílias com a síndrome das plaquetas cinzentas, os neutrófilos são também acentuadamente hipogranulados [192]. A síndrome de plaquetas cinzentas nem sempre é um defeito isolado; já foi descrita associada com as síndromes de Chédiak-Higashi, de Hermansky-Pudlak, de Griscelli, de Wiskott-Aldrich, com trombocitopenia

com rádios ausentes (TAR) e trombocitopenia resultante de mutação *GATA1* [304, 305]. Plaquetas cinzentas também foram identificadas como um aspecto da síndrome dos lactentes de disfunção artrogripose, disfunção renal e colestasia (ARC) [306]. Todas as causas hereditárias de plaquetas agranuladas são raras. É mais comum plaquetas aparentemente

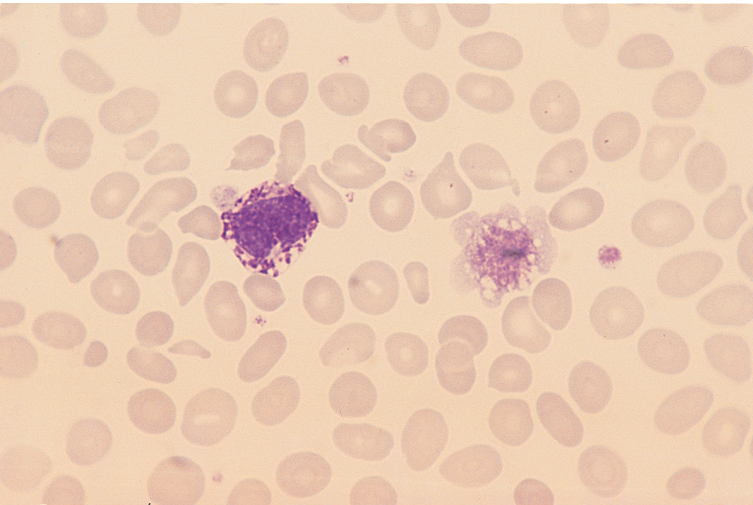
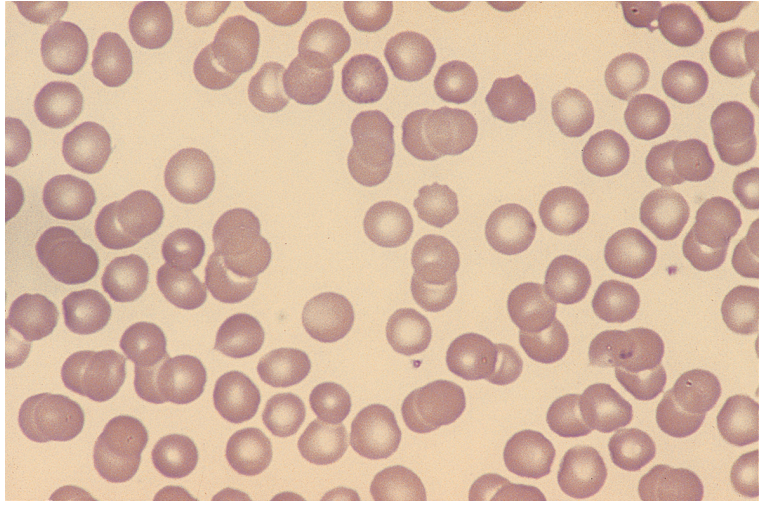


FIGURA 3.156 Plaqueta gigante, quase tão grande quanto o basófilo adjacente, no sangue periférico de paciente com mielofibrose primária. Há, também, uma plaqueta de tamanho normal. Os eritrócitos mostram policitose.

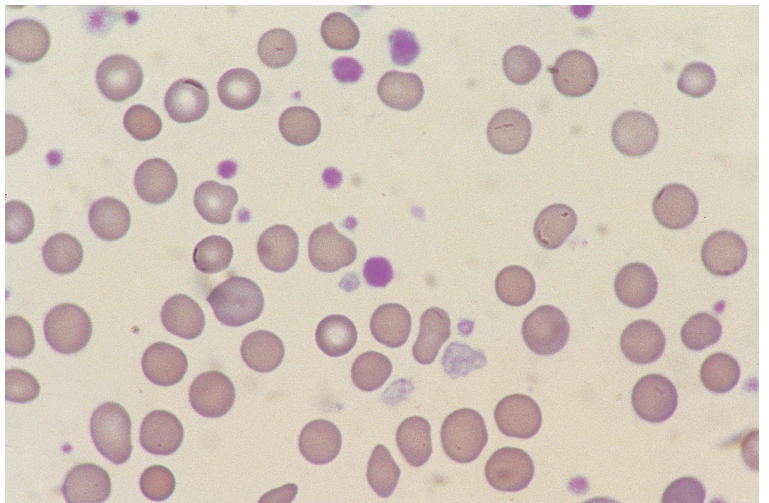
FIGURA 3.157 Distensão sanguínea de paciente com síndrome de Wiskott-Aldrich, mostrando trombocitopenia e plaquetas pequenas.



agranuladas resultarem da liberação dos grânulos *in vivo* ou *in vitro*, ou da formação de plaquetas defeituosas por megacariócitos displásicos (Figura 3.158). Quando a punção venosa é difícil, a ativação das plaquetas pode causar a liberação de grânulos. Quando esta associa-se à agregação, são vistos conglomerados de plaquetas agranuladas. Fenômeno semelhante pode, raramente, ser causado por um fator plasmático, que produz degranulação [303] ou degranulação e agregação plaquetária *in vitro* [307]; em um dos pacientes estudados, o fator originou-se de um leiomiossarcoma [308]. A degranulação pode ser restrita a plaquetas em sangue anticoagulado com EDTA, não ocorrendo quando se usa heparina ou citrato [303, 309]. O *bypass* cardiopulmonar pode provocar a liberação de α -grânulos, e as plaquetas agranuladas

continuam a circular. Na leucemia de células pilosas, plaquetas agranuladas resultam de degranulação dentro de canais vasculares anormais, pseudossínus revestidos por células pilosas, presentes no baço e em outros órgãos. Algumas plaquetas agranuladas são vistas nas SMDs, provavelmente indicativas de trombopoese defeituosa. Nas neoplasias mieloproliferativas, plaquetas agranulares podem decorrer de defeito na trombopoese ou de perda dos grânulos de plaquetas hiperagregáveis. Tanto nas síndromes mielodisplásicas quanto nas mieloproliferativas, as plaquetas podem ser gigantes e dismórficas, características, mais uma vez, de trombopoese anormal. Na anomalia de May-Hegglin, as plaquetas não somente são maiores do que as normais como também podem se apresentar com forma anormal, por

FIGURA 3.158 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mieloide crônica mostrando plaquetas normalmente granuladas e plaquetas agranuladas. Também há anisocitose plaquetária.



exemplo, formato de charuto [310]. Uma população de plaquetas com um ou mais grânulos gigantes, corados em vermelho com corante de Romanowsky, foi descrita em dois membros de uma família com trombocitopenia e deleção 11q23 [311]; esse defeito foi chamado de síndrome de Jacobsen ou trombocitopenia de Paris-Trousseau.

Dentro das plaquetas, podem ser encontradas partículas estranhas, por exemplo, parasitos da malária [312]. Não é provável que isso represente fagocitose; deve tratar-se de emperipolese, fenômeno no qual leucócitos e outras partículas penetram no sistema conectado à membrana do megacariócito.

É muito importante notar a presença de agregados plaquetários, pois estes costumam provocar significativa, trombocitopenia espúria. A agregação plaquetária pode resultar da ativação plaquetária durante a coleta por picada na pele ou punção venosa, ou ser mediada por imunoglobulina. Quando há coagulação incipiente do sangue, ocorre degranulação parcial das plaquetas, e podem ser observados filamentos de fibrina na lâmina. Agregação plaquetária *in vivo* foi relatada raramente na doença de von Willebrand tipo 2B, juntamente com trombocitopenia e algumas plaquetas grandes [313]. É possível haver agregação plaquetária *in vitro*, em particular em sangue anticoagulado pelo EDTA, mediada por um anticorpo frio, com especificidade contra as glicoproteínas IIb/IIIa das plaquetas [314]. Esse anticorpo não tem significado clínico, mas é importante fazer constar sua presença, já que causa trombocitopenia espúria. O fenômeno pode ser visto de modo transiente no recém-nascido, pela passagem

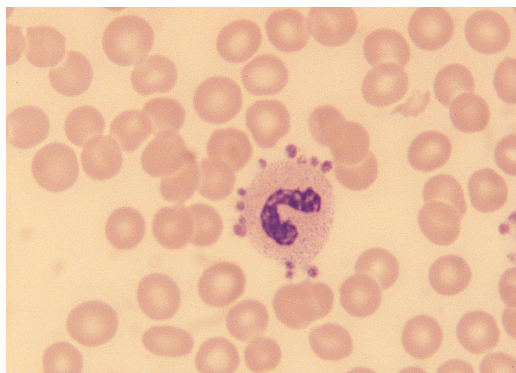


FIGURA 3.159 Distensão sanguínea mostrando satelitismo plaquetário.

transplacentária do anticorpo causal [315]. Agregação plaquetária EDTA-dependente pode ser induzida pelo tratamento com anticorpo monoclonal antiglicoproteína IIb/IIIa, como o abciximabe, podendo durar vários dias após cessado o tratamento [316].

Satelitismo plaquetário (Figura 3.159) é um fenômeno *in vitro*, que ocorre particularmente, mas não só, em sangue anticoagulado com EDTA; é induzido por um fator plasmático, em geral IgG ou IgM, que faz as plaquetas aderirem ao CD16 dos neutrófilos [317]. Plaquetas aderem aos neutrófilos e circundam-nos, podendo algumas serem fagocitadas [318]. Os neutrófilos podem unir-se pelas camadas de plaquetas; o satelitismo pode ser seguido de fagocitose [319] (Figura 3.160). Ocasionalmente, o satelitismo envolve outras células normais, como linfócitos [320], linfócitos grandes e granulares [317],

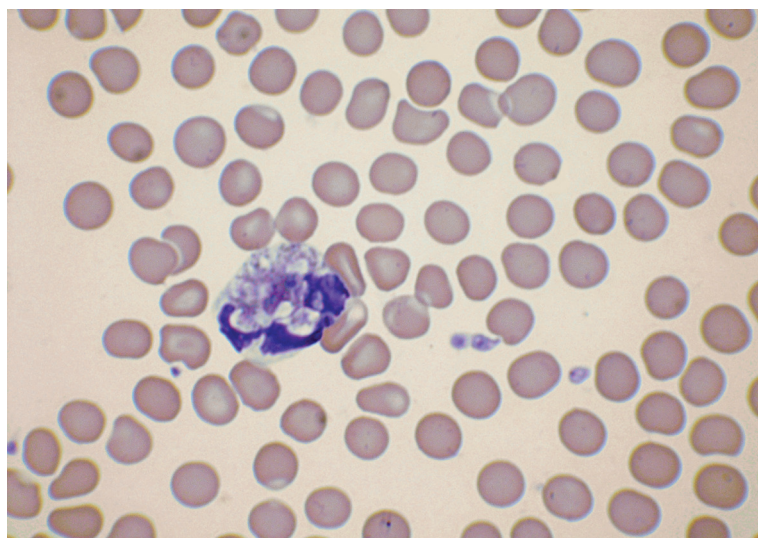


FIGURA 3.160 Distensão sanguínea mostrando fagocitose de plaquetas.

eosinófilos [321], monócitos [321] ou basófilos. Foi observada reversão desse fenômeno após tratamento de uma doença autoimune [322]. O satelitismo plaquetário não tem significado clínico, mas provoca uma contagem de plaquetas incorretamente baixa.

O satelitismo plaquetário em torno de células linfomatosas, como fenômeno não dependente de EDTA, foi observado em um único caso de linfoma de células do manto [324] e como fenômeno EDTA-dependente em caso de linfoma da zona marginal [324], neste caso associada com linfoaglutinação. Satelitismo plaquetário tem ocorrido ocasionalmente em torno de basófilos leucêmicos [320].

O satelitismo plaquetário pode interferir na imunofenotipagem das células envolvidas.

Megacariócitos

Megacariócitos raramente são vistos no sangue de adultos saudáveis; quando liberados da medula óssea, a maioria é retida nos capilares pulmonares. Como às vezes são detectados, ainda que em baixo número, em sangue venoso proveniente de partes do corpo desprovidas de medula hematopoética, comprova-se que alguns vencem a barreira pulmonar. Como estão presentes apenas em número estimado de 5 a 7 por mililitro de sangue, é mais fácil encontrá-los em preparações da camada de leucócitos ou com procedimentos especiais de concentração. Em indivíduos saudáveis, 99% dos megacariócitos encontrados no sangue venoso periférico são quase desprovidos de citoplasma (Figura 3.161), mas há raríssimos com citoplasma abundante. O número de megacariócitos é maior no sangue dos recém-nascidos e dos

lactentes, no pós-parto, no pós-operatório e em pacientes com infecção, inflamação, doença maligna, coagulação intravascular disseminada e neoplasias mieloproliferativas [325-328]. Em recém-nascidos, o número correlaciona-se com prematuridade e com a síndrome de insuficiência respiratória [329]. O número no sangue venoso aumenta durante e após *bypass* cardiopulmonar [330]. A proporção de megacariócitos intactos, com citoplasma abundante, é maior em lactentes [326] e em pacientes com mielofibrose primária e LMC [328].

Megacariócitos anormais e megacarioblastos

Em condições patológicas, podem ser vistos megacariócitos anormais e megacarioblastos no sangue.

Micromegacariócitos são vistos no sangue de alguns pacientes com neoplasias hematológicas, como mielofibrose primária (Figura 3.162) e LMC (especialmente quando em transformação). São pequenas células mononucleadas diploides, com diâmetro de 7 a 10 μm , nem sempre identificadas de imediato como megacariócitos. O núcleo é redondo ou ligeiramente irregular, com cromatina densa. O citoplasma varia de moderado a escasso, a ponto de o núcleo parecer “nu”, mas a microscopia eletrônica mostra que mesmo essas células têm uma estreita orla de citoplasma, fracamente basófilo. Pode haver vacuolização citoplasmática ou grânulos citoplasmáticos de raros a numerosos. Às vezes, há pequenas protrusões citoplasmáticas ou “bolhas” (*blebs*), e, também, às vezes, plaquetas parecem estar “brotando” da superfície. Na leucemia megacarioblástica aguda, incluindo a mielopoese anormal transiente da síndrome de Down, são vistos

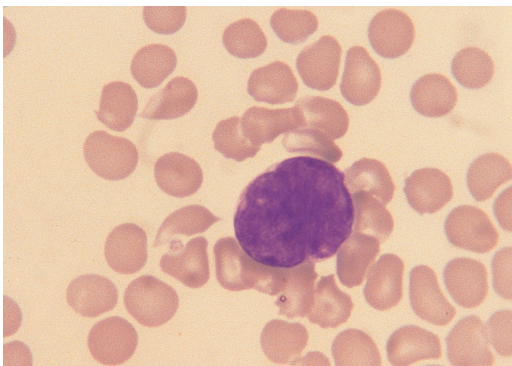


FIGURA 3.161 Núcleo nu de megacariócito em distensão de sangue periférico de indivíduo sadio; o tamanho e a lobulação do núcleo indicam que se originou de megacariócito poliploide.

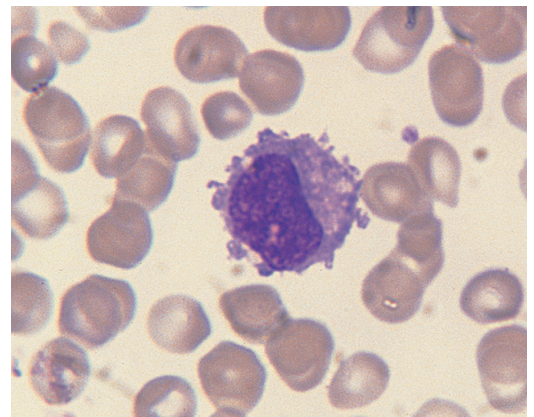


FIGURA 3.162 Micromegacariócito em distensão de sangue periférico de paciente com mielofibrose idiopática.

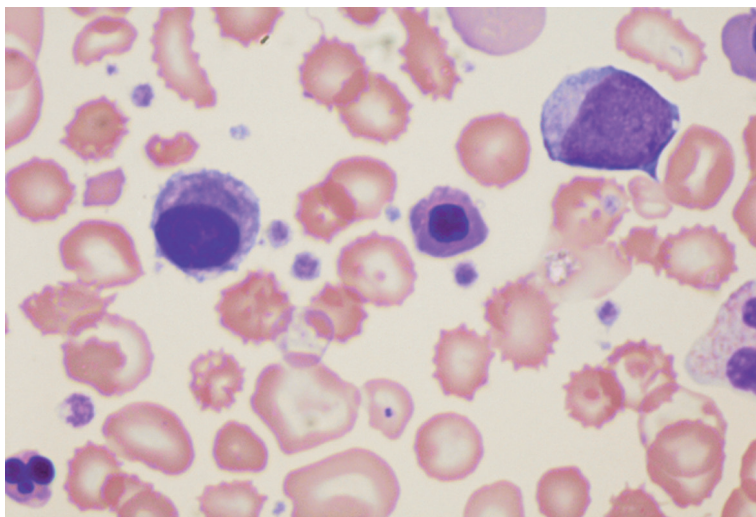


FIGURA 3.163 Micromegacariócitos em distensão de sangue periférico de recém-nascido com mielopoese anormal transiente da síndrome de Down. Há ainda um blasto e um eritroblasto.

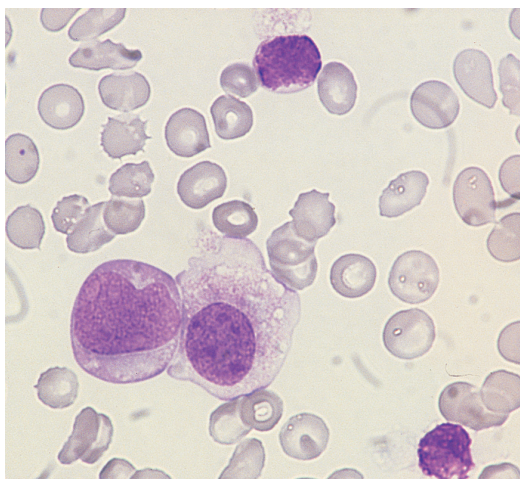


FIGURA 3.164 Distensão de sangue periférico de paciente com transformação megacarioblástica de leucemia mieloide crônica mostrando três megacarioblastos. Um é grande, sem características distintivas; outro mostra certo grau de maturação e tem citoplasma que lembra o de uma plaqueta; e o terceiro lembra um linfoblasto. A linhagem foi confirmada por citoquímica ultra estrutural.

micromegacariócitos um pouco maiores, com citoplasma granular bem-desenvolvido (Figura 3.163).

Megacarioblastos (Figura 3.164) têm um diâmetro entre 10 μm e 15-20 μm ou mais. Os menores podem assemelhar-se a linfoblastos e não apresentar características distintivas; os maiores têm padrão cromatínico difuso e basofilia citoplasmática de fraca a moderada. O citoplasma, em quantidade escassa a moderada, pode formar bolhas. Com frequência, os megacarioblastos não são identificáveis somente pela morfologia.

A distensão de sangue em indivíduos sadios

Em adultos sadios

A microscopia do sangue do adulto normal mostra apenas ligeira variação no tamanho e no formato dos eritrócitos (ver Figuras 3.16 e 3.66). Os leucócitos normalmente presentes são neutrófilos segmentados e bastonados, eosinófilos basófilos, linfócitos e monócitos. Metamielócitos e mielócitos são raros. Megacariócitos, em geral na forma de núcleos nus, são raríssimos. Plaquetas estão presentes em número tal que a relação eritrócitos/plaquetas é da ordem de 10-40:1.

Na gravidez

Na gravidez, há maior variação no formato e no tamanho dos eritrócitos; o VCM aumenta, com valor máximo entre a trigésima e a trigésima quinta semanas. É uma alteração independente de deficiência de vitamina B₁₂ ou de ácido fólico, embora as necessidades de ácido fólico aumentem na gravidez. A Hb cai, com valor mínimo entre a trigésima e a trigésima quarta semanas de gestação. Embora tanto a deficiência de ferro quanto a de ácido fólico tenham prevalência aumentada na gravidez, a queda de Hb não se deve a um estado de carência; na verdade, ocorre apesar de haver um aumento real da massa eritrocítica circulante. É consequência de um aumento ainda maior da volemia plasmática. A VSG e a formação de *rouleaux* também aumentam. Há certa policromatocitose e a contagem de reticulócitos aumenta até um pico de 6% entre a vigésima quinta e a trigésima semanas.

As contagens de leucócitos, de neutrófilos e de monócitos aumentam, e os neutrófilos podem

mostrar granulação tóxica e corpos de Döhle. Há desvio à esquerda: os bastonados aumentam, mielócitos e metamielócitos são comuns, e é possível encontrar raríssimos promielócitos e até mieloblastos. Podem ser vistos raros eritroblastos, mas alguns deles podem ser eritroblastos de origem fetal na circulação materna [331]. As contagens de leucócitos e de neutrófilos continuam a subir até o termo. Diminui o número absoluto de linfócitos e de eosinófilos. Nos instrumentos Bayer H.1, aumentam o índice de índice lobularidade (LI) e o índice de peroxidase média (MPXI).

As contagem e o tamanho das plaquetas em geral não se alteram durante a gravidez normal, mas pode haver diminuição da contagem e aumento do volume plaquetário médio (VPM) se a gravidez se complicar com hipertensão (“toxemia”). Em uma pequena porcentagem de mulheres com gravidez não complicada, ocorre trombocitopenia, de mecanismo desconhecido. Limites de referência para os parâmetros hematológicos na gravidez são apresentados na Tabela 5.14.

Em lactentes e em crianças

Em lactentes e em crianças normais, os eritrócitos são hipocrômicos e microcíticos, em comparação com eritrócitos de adultos; VCM e HCM são mais baixos. A deficiência de ferro é comum na infância, mas a diferença desses valores em relação aos adultos está presente mesmo quando não existe deficiência de ferro. As diferenças entre os sexos na hemoglobina (Hb), na contagem de eritrócitos (E) e no hematócrito (Hct) aparecem somente na puberdade.

O número de linfócitos nas crianças é superior ao de adultos, e a porcentagem de linfócitos comumente excede a de neutrófilos (“contagem diferencial invertida”). Há maior porcentagem de linfócitos grandes, alguns deles com nucléolos visíveis. As alterações reacionais dos linfócitos, em resposta à infecção e a outros estímulos imunológicos, são bem mais comuns do que nos adultos, e até mesmo crianças que parecem saudáveis podem apresentar alguns linfócitos “atípicos”.

Limites de referência para os parâmetros hematológicos nos lactentes e nas crianças são apresentados nas Tabelas 5.10 a 5.13.

Em recém-nascidos

O sangue do recém-nascido mostra características hipoesplênicas (ver a seguir), especificamente corpos de Howell-Jolly, acantócitos e esferócitos. Esferócitos, entretanto, são mais numerosos do que no adulto hipoesplênico. As contagens de leucócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos são bem maiores

no recém-nascido do que na criança maior ou no adulto. Eritroblastos são comuns e mielócitos não são raros; há número maior de megacariócitos circulantes, e a proporção de micromegacariócitos está aumentada [332]. Hb, E e Hct são mais altos do que em qualquer outra época posterior ao nascimento, e a consequente elevação da viscosidade sanguínea dificulta as distensões de sangue, que ficam com aspecto “abarrotado” (*packed*). Essa poliglobulia fisiológica causa uma VSG muito baixa. Os eritrócitos são maiores do que nas crianças de mais idade e nos adultos. A contagem de reticulócitos é elevada nos três primeiros dias após o nascimento [333].

Nos primeiros dias e semanas de vida extra-uterina, ocorrem alterações fisiológicas nas cifras hematimétricas. As contagens iniciais de leucócitos e de neutrófilos aumentam até um pico de 60%, em média, cerca de 12 horas após o nascimento [334]. A contagem cai até níveis inferiores aos do nascimento nas 72 horas subsequentes. A contagem de linfócitos atinge um nadir em torno das 72 horas, tornando a aumentar outra vez [334]. Ao fim da primeira semana, o número de neutrófilos já é inferior ao de linfócitos. Se houve clameamento tardio do cordão umbilical, aumentam proporcionalmente a E, Hb e Hct, devido à autotransfusão a partir da placenta, seguida de redução do volume plasmático. Os eritroblastos em geral desaparecem do sangue em torno do quarto dia nos bebês a termo; ao fim da primeira semana, a maioria dos mielócitos e metamielócitos também já desapareceu. Os neutrófilos bastonados são mais numerosos nos primeiros dias, atingindo um platô em torno do quinto dia.

Valores de referência para o período neonatal são apresentados nas Tabelas 5.8 e 5.9.

Em recém-nascidos prematuros

Nos prematuros, as cifras hematológicas diferem das observadas nos bebês a termo. Nas distensões de sangue, há maior número de eritroblastos, metamielócitos, mielócitos, promielócitos e mieloblastos. As características hipoesplênicas são bem mais acentuadas do que nos bebês a termo (Figura 3.165), podendo persistir nos primeiros meses. Os prematuros frequentemente desenvolvem eosinofilia entre a segunda e a terceira semanas após o nascimento [335].

Hipoesplenismo

A esplenectomia, em indivíduos hematologicamente normais, provoca alterações características na citologia do sangue periférico. As mesmas alterações

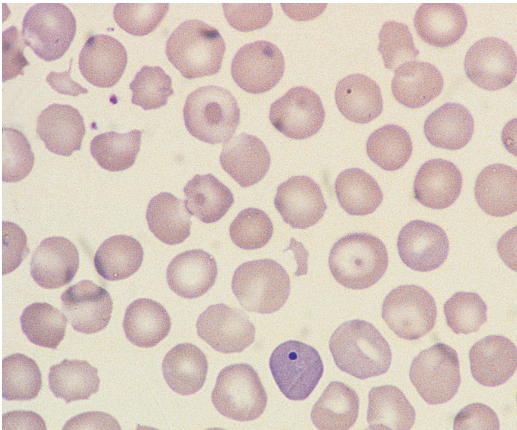


FIGURA 3.165 Distensão sanguínea de recém-nascido prematuro sadio mostrando macrocitose (relativamente ao adulto), um corpo de Howell-Jolly em um eritrócito policromático, eritrócitos em alvo (*target cells*) e esquizócitos.

são vistas quando há asplenia congênita, atrofia ou infarto esplênico extenso ou, por qualquer razão, o baço torna-se não funcionante. Às vezes, quando o baço é densamente infiltrado por células anormais, são observadas características de hipoesplenismo, mesmo havendo esplenomegalia.

Imediatamente após esplenectomia, há trombocitose e acentuada neutrofilia. Quando ocorre infecção pós-esplenectomia, a neutrofilia e o desvio à esquerda são consideráveis. Após a recuperação da cirurgia, a contagem de neutrófilos cai a níveis quase normais, e a contagem de plaquetas baixa e estaciona no limite superior da normalidade ou um pouco acima, cerca de 500 a 600.000/ μL . Há linfocitose e monocitose, que persistem indefinidamente; a linfocitose costuma ser moderada, mas pode chegar a 10.000/ μL [336]. É característico o aumento de linfócitos grandes e granulados (ver Figura 9.10), imunologicamente NK (células *natural killer*) [337, 338]. Linfócitos T e B também podem aumentar [339]. Em indivíduos normais, a Hb não se altera após a esplenectomia, mas há alteração na morfologia eritrocitária (ver Figuras 3.44 e 3.51): há eritrócitos em alvo (*target cells*), acantócitos, corpos de Howell-Jolly, raros corpúsculos de Pappenheimer (a coloração para ferro confirma os grânulos sideróticos), eritroblastos ocasionais e pequeno número de esferócitos. Nas distensões com a coloração usual, às vezes podem ser vistos pequenos vacúolos nos eritrócitos; à microscopia de interferência em contraste de fase, aparecem como “depressões” ou “crateras” (*pits*), mas são, na verdade, vacúolos autofágicos [340]. A contagem de reticulócitos está

aumentada. A coloração apropriada mostra pequeno número de corpos de Heinz. Podem ser notadas algumas plaquetas grandes, e o volume VPM é maior, em relação à contagem de plaquetas, do que em pessoas não espletomizadas.

Em pacientes com distúrbios hematológicos subjacentes, após a esplenectomia, em geral o grau de anormalidades aumenta. Quando há anemia que persiste após a esplenectomia, costuma ocorrer acentuada trombocitose. Se havia formação de corpos de Heinz (por hemoglobina instável ou por uso de droga oxidante), estes serão vistos em grande número, pela falta da ação filtrante (*pitting*) do baço. Quando há sobrecarga eritroblástica de ferro (como na anemia sideroblástica ou na talassemia maior), corpúsculos de Pappenheimer tornam-se numerosos. Se a medula óssea for megaloblástica ou diseritropoética, os corpos de Howell-Jolly serão particularmente grandes e numerosos.

Algumas das causas de hipoesplenismo são apresentadas na Tabela 3.13.

TABELA 3.13 Algumas causas de hipoesplenismo	
Fisiológicas	Período neonatal (particularmente em prematuros ou com restrição de crescimento intrauterino), idade avançada
Patológicas	
Congênicas	Ausência congênita ou hipoplasia (pode ser hereditária [341]; pode estar associada à <i>situs inversus</i> e à anomalias cardíacas; pode estar associada à anoftalmia e à agênese do corpo caloso [342]; ocorre na agenesia reticular e na anemia de Fanconi [343]; já foi descrita na síndrome de Pearson; pode ser causada pela ingestão materna de cumarínicos; associada à síndrome ATRX [344])
	Involução prematura hereditária (autossômica dominante) do baço
	Poliesplenismo congênito [345]
Adquiridas	
Esplenectomia	Infarto esplênico (drepanocitose, drepanocitose/hemoglobinopatia C e outras síndromes síclêmicas; trombocitemia essencial; policitemia vera; após torção esplênica; consequente à infecção aguda [346])
	Atrofia esplênica (associada à doença celíaca, dermatite herpetiforme, colite ulcerativa [347], doença de Crohn [347] e espru tropical [348]; atrofia esplênica autoimune, incluindo a associada à doença tireoideia autoimune, ao lúpus eritematoso sistêmico [349] e à doença poliglandular autoimune [350]; doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro [351]; após irradiação esplênica [352] ou administração de Thorotrast [353])
	Infiltração ou substituição do tecido esplênico (amiloidose, sarcoidose, leucemia e linfoma [ocasionalmente]; carcinoma [354] e [raramente] sarcoma [355], granulomas causados por micobactérias atípicas na aids [356])
	Exposição a asbesto (um caso) [357]
	Asplenia funcional, por exemplo, causada por sobrecarga reticuloendotelial (no início da evolução da drepanocitose, nas anemias hemolíticas severas e nas doenças auto-imunes ou por complexos imunes) [358]

Evidências de hipoesplenismo devem ser procuradas especificamente na distensão sanguínea quando se apresentam crianças com sepse pneumocócica [359] e quando há suspeita de doença celíaca e outras enteropatias inflamatórias crônicas.

Células não hematopoéticas circulantes

Células não hematopoéticas podem ser vistas no sangue tanto por estarem presentes na circulação como por contaminação durante a coleta; esta última eventualidade é particularmente comum nas coletas de sangue por picada da pele.

Células endoteliais

Células endoteliais (Figuras 3.166 e 3.167) são vistas com mais frequência em distensões feitas com a primeira gota de sangue da agulha, o que era mais comum no passado, quando as agulhas eram reutilizadas e, por isso, podiam ter a ponta áspera [360]. Células endoteliais podem aparecer isoladamente ou em grupos; são células grandes, com frequência alongadas, com diâmetro de 20-30 μm e abundante citoplasma azul-pálido ou azul-acinzentado. O núcleo é redondo ou oval, com um diâmetro de 10-15 μm e 1 a 3 nucléolos azuis-claros. Os núcleos mostram sulcos paralelos.

O número de células endoteliais está aumentando em condições nas quais existe lesão vascular: na infecção por riquetsia, nas doenças vasculares periféricas, na infecção por CMV, na púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), na anemia de células falciformes e após angioplastia coronariana; contudo, mesmo nesses casos, são muito raras [361].

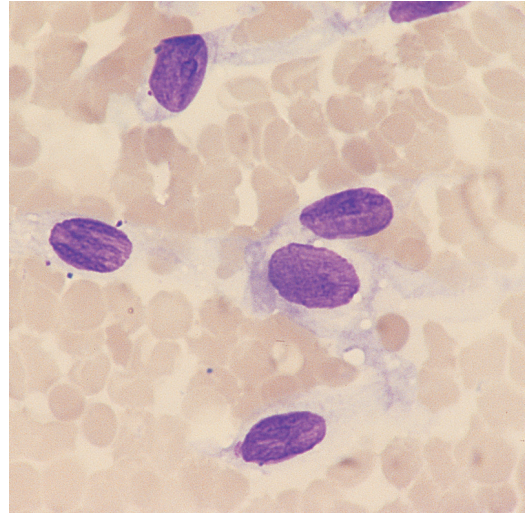


FIGURA 3.166 Células endoteliais obtidas por raspagem da veia cava durante necropsia. Cortesia da Dra. Marjorie Walker, Newcastle, Austrália.

Células infectadas por vírus, interpretadas como células endoteliais anormais, foram descritas no sangue de pacientes com imunodeficiência e infecção ativa por CMV [362]. Tinham diâmetro de 50-60 μm , com abundante citoplasma basófilo e uma zona eosinófila central que parecia deslocar o núcleo.

Células epiteliais

Quando o sangue é obtido por picada cutânea, células epiteliais podem aparecer ocasionalmente na distensão. Elas são grandes, com núcleo pequeno e amplo citoplasma amorfo, azul-celeste (Figura 3.168a). Algumas são anucleadas (Figura 3.168b).

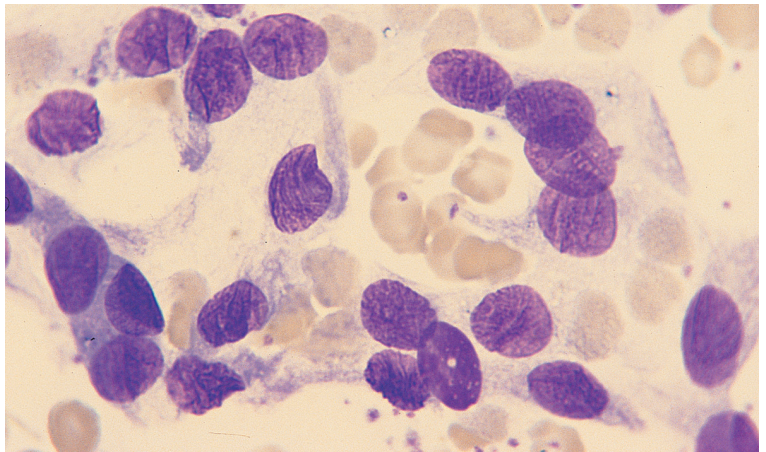


FIGURA 3.167 Células endoteliais em distensão de amostra de sangue venoso periférico.

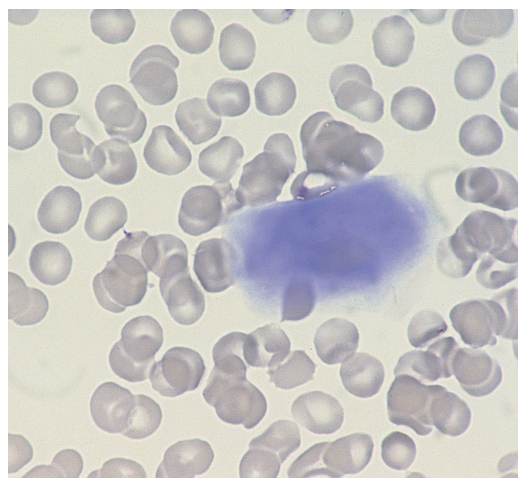
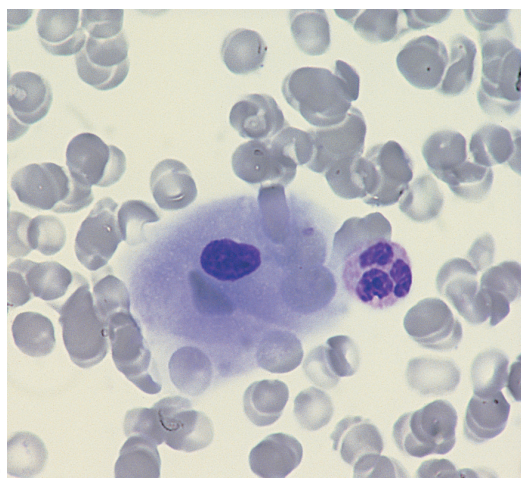


FIGURA 3.168 Células epiteliais em distensão de sangue obtido por picada digital: (a) célula epitelial nucleada e (b) célula epitelial anucleada.

Células gordurosas

Algumas vezes, são vistas no sangue (Figura 3.169); é provável que tenham sido deslocadas do tecido subcutâneo pela penetração da agulha.

Células mesoteliais

Células mesoteliais foram notadas em uma distensão de sangue coletado após fraturas múltiplas de costelas [363].

Células do líquido amniótico

Células do líquido amniótico podem estar presentes se houver contaminação durante a coleta de sangue fetal.

Células malignas não hematopoéticas e mucina

Células de vários tumores de células pequenas da infância podem circular no sangue em número apreciável e ser confundidas com linfoblastos de LLA; elas têm sido descritas em neuroblastoma, rhabdomyosarcoma e meduloblastoma [364-366]. No rhabdomyosarcoma, foram descritas no sangue até massas sinciciais de células tumorais [367]. Células circulantes de neuroblastoma raramente podem estar associadas com neurofibrilas [368]. Células carcinomatosas também podem circular no sangue, mas em geral isso ocorre em número tão pequeno que quase nunca são detectadas, a não ser com

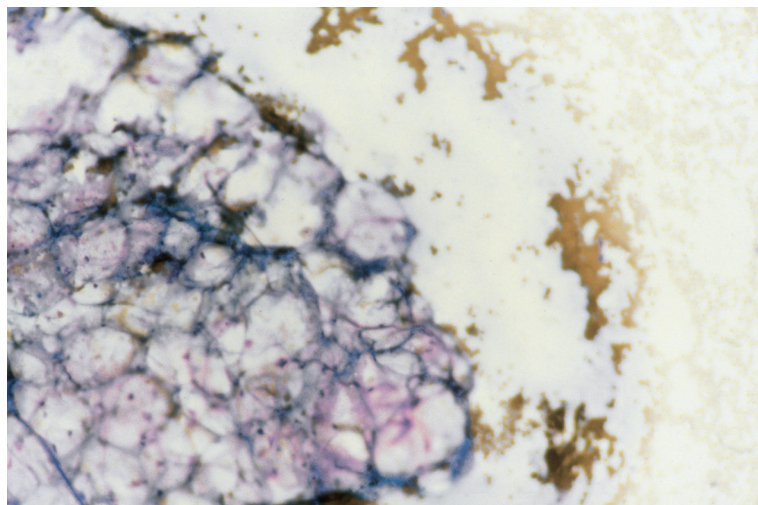
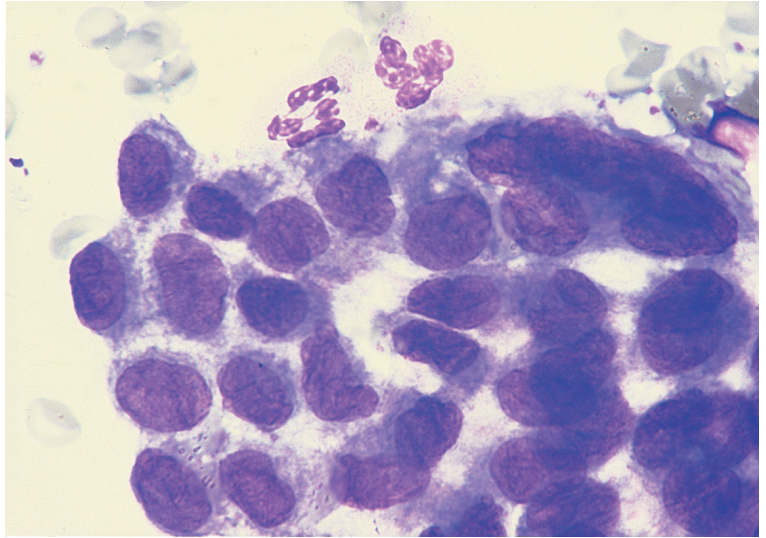


FIGURA 3.169 Conglomerado de células gordurosas, provavelmente do subcutâneo, em sangue anticoagulado com EDTA coletado por punção venosa (objetiva 40 ×).

FIGURA 3.170 Células malignas na distensão de sangue periférico de um paciente, subsequentemente identificado como portador de adenocarcinoma metastático disseminado.

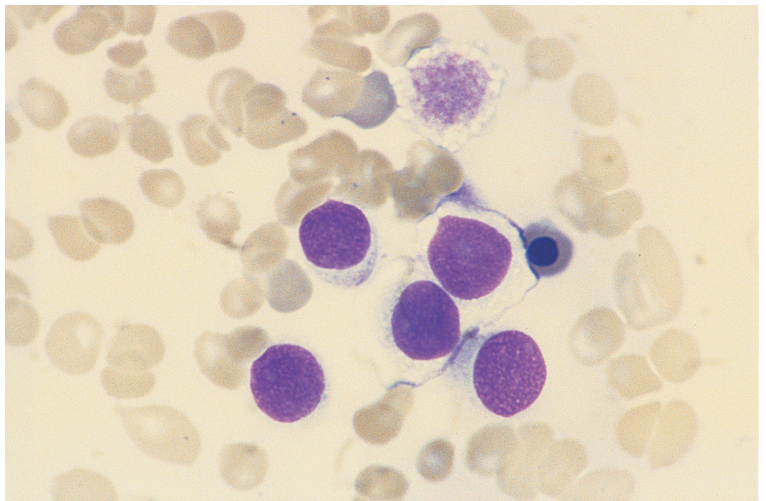


procedimentos de concentração [369]. O aspecto da Figura 3.170, em distensão rotineira de sangue, é uma raridade. Mais rara ainda é a ocorrência de “leucemia” de células carcinomatosas: a “carcinocitemia” tem sido descrita com mais frequência em carcinomas de mama e pulmão [370] (Figura 3.171). Células malignas podem apresentar-se no sangue dispostas em aglomerados, às vezes tão grandes que podem ser vistos macroscopicamente (ver Figura 3.4). Raramente, encontram-se células de melanoma, até em grande número [371]; quando amelanóticas, podem confundir-se com células de leucemia aguda; quando têm melanina, são facilmente identificadas [372] (Figura 3.172).

Foi relatada a presença de mucina em distensões sanguíneas, dentro de neutrófilos ou livre, em casos de adenocarcinoma [7] e tumor de Wilms [373]. Mucina livre pode ser corada com azul-de-alcian e pode ser eliminada da distensão tratando-a com hialuronidase [374].

Em pacientes com doença de Hodgkin avançada, muito raramente, podem ser vistas células de Reed-Sternberg e células mononucleadas de Hodgkin no sangue [375]. É ainda muito mais rara a presença em número tão grande a ponto de constituírem-se em leucemia de células de Reed-Sternberg. Em um desses pacientes, a contagem leucocitária total foi de 140.000/ μ L, com 92% de células

FIGURA 3.171 Células malignas no sangue periférico de paciente com história pregressa de carcinoma de mama, subsequentemente identificada como tendo doença metastática disseminada.



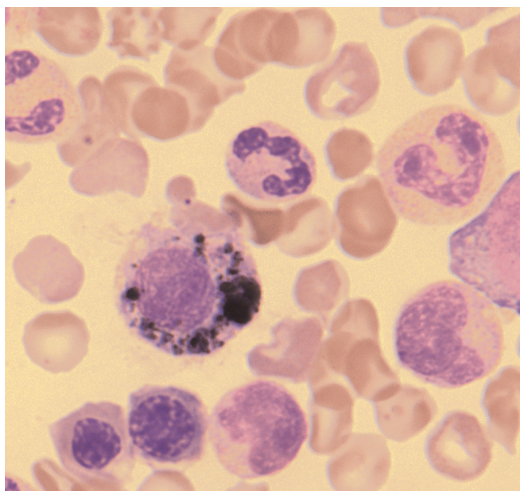
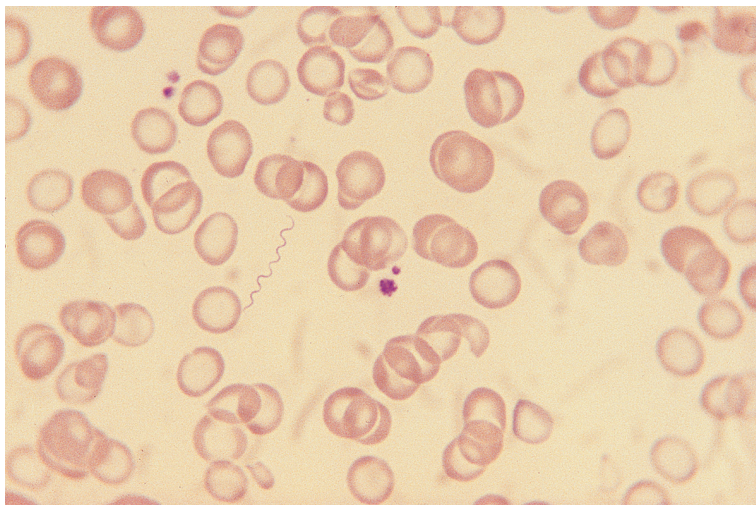


FIGURA 3.172 Célula de melanoma, contendo melanina, no concentrado de leucócitos de paciente com melanoma disseminado e anemia leucoeritoblástica; a medula óssea estava infiltrada pelo tumor. Cortesia do Dr. John Luckit e do falecido Dr. David Swirsky.

malignas [376], células de Reed-Sternberg típicas (células gigantes com diâmetro de 12-40 μm , com núcleos em imagem de espelho e nucléolos gigantes) e células de Hodgkin multi e mononucleadas, também com nucléolos gigantes. É importante observar que não há descrições recentes de células de Reed-Sternberg ou de Hodgkin circulantes, inclusive em pacientes com infecção por HIV, apresentando-se com doença disseminada; descrições dessas células antecedem a disponibilidade de técnicas de imunofenotipagem.



Microrganismos em distensões de sangue

Em pacientes com infecções bacterianas, fúngicas ou parasitárias, podem ser evidenciados microrganismos livres entre as células ou dentro de eritrócitos, neutrófilos ou monócitos. Podem ser vistos em distensões coradas com MGG, mas colorações especiais ajudam a identificá-los. Os únicos microrganismos observados com razoável frequência são os parasitos da malária, mas o encontro fortuito de outros microrganismos à microscopia do sangue pode ser útil, levando a diagnóstico e tratamento mais precoces.

Bactérias

Nas febres recorrentes veiculadas por piolhos e carrapatos, os espiroquetas causadores, *Borrelia recurrentis*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia turicata*, *Borrelia parkeri* ou *Borellia hermsii*, são vistos livres entre as células (Figura 3.173). Os organismos podem ser detectados à microscopia do sangue periférico em 70% dos casos de febre recorrente veiculada por carrapato [377]. O exame de gota espessa é útil na pesquisa de *Borrelia*.

É muito raro encontrar, em distensões sanguíneas de rotina, outras bactérias que não a *Borrelia*. Quando presentes, são mais comuns dentro de neutrófilos, mais raramente, livres entre as células. Quando se procura deliberadamente por bactérias, uma preparação da camada de leucócitos (*buffy coat*) facilita a detecção. Bactérias são vistas com mais frequência em indivíduos hipoesplênicos ou imunossupressos, em pacientes com cateteres

FIGURA 3.173 *Borrelia* no sangue periférico de uma criança norte-africana com febre.

intravenosos ou com infecções disseminadas. Bactérias que têm sido observadas dentro de neutrófilos em distensões rotineiras de sangue periférico incluem estreptococos, estafilococos, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), *Neisseria meningitidis* (meningococo); (Figura 3.174), espécie de *Clostridium perfringens*, *Yersinia pestis*, *Bacteroides distasonis* [378], *Corynebacterium* [371], *Capnocytophaga canimorsus* (Figura 3.175) [379], *Escherichia coli* [380], *Klebsiella pneumoniae* [380], *Klebsiella oxytoca* [381], *Pseudomonas aeruginosa* [382], *Legionella pneumophila* [383] e *Citrobacter koseri* [384].

Na bartonelose ou febre de Oroya (Figura 3.176), doença restrita à América do Sul, o bacilo flagelado

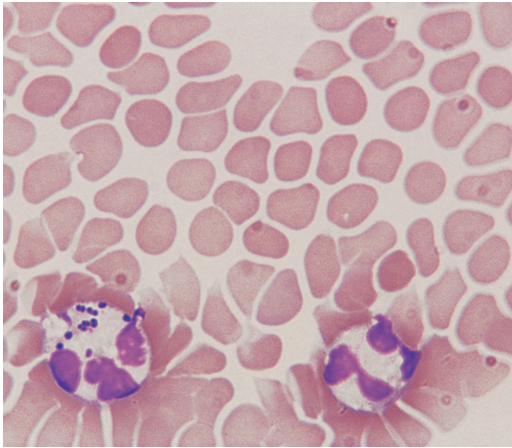
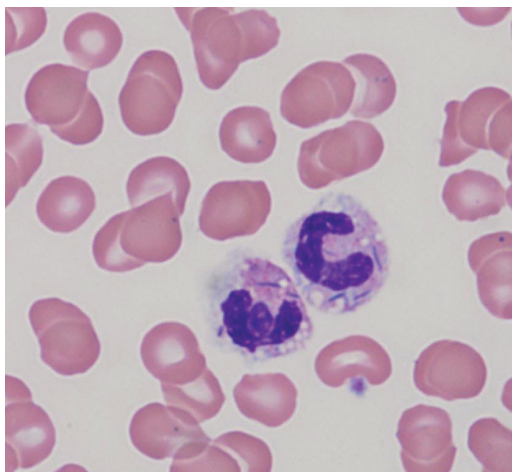


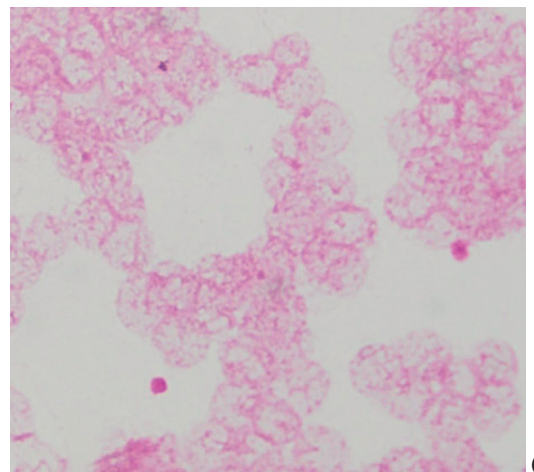
FIGURA 3.174 Neutrófilo contendo diplococos, de um paciente com septicemia fatal por *Neisseria meningitidis*.

causador está presente na superfície dos eritrócitos, e a infecção provoca esferocitose e anemia hemolítica. O organismo *Bartonella bacilliformis* cora-se de vermelho-escuro ou púrpura com o corante MGG [385]. O agente causal da febre das trincheiras, *Bartonella quintana*, foi detectado por imunofluorescência em eritrócitos do sangue periférico [386], de modo que provavelmente pode ser detectado também em distensões coradas com MGG. Bacilos hemotrópicos, *Tropheryma whipplei*, foram também descritos em indivíduos hipoesplênicos com doença de Whipple (Figura 3.177), e foram identificados como inclusões PAS-positivas nos monócitos de outro paciente [387]. Exemplos de *Grahamella* intraeritrocíticos foram descritos em três pacientes do Leste Europeu [388]. Estruturas baciliformes, aparentemente associadas com eritrócitos, e suspeitas de natureza bacteriana, foram descritas em pacientes com PTT [389].

Em monócitos, e até em linfócitos e plaquetas, ocasionalmente são vistos microrganismos. *Tropheryma whipplei* foi detectado em monócitos por coloração imunocitoquímica de uma preparação de concentrado de leucócitos [390]. Na infecção por HIV, a observação de imagens baciliformes negativas dentro de monócitos ou neutrófilos sugere infecção por *Mycobacterium avium intracellulare* [391]. *Ehrlichiae* e anaplasma podem ser detectadas em neutrófilos, monócitos e, raramente, linfócitos. Podem aparecer como organismos isolados ou como mórulas, contendo vários corpos elementares (Figura 3.178). Na anaplasmosse granulocítica humana (antes denominada erliquiose granulocítica humana), causada por *Anaplasma fagocytophilum*



(a)



(b)

FIGURA 3.175 Distensão sanguínea de paciente mordido por um cão, mostrando *Capnocytophaga canimorsus*: (a) coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG); (b) coloração de Gram. Cortesia do falecido Dr. Alan Mills.

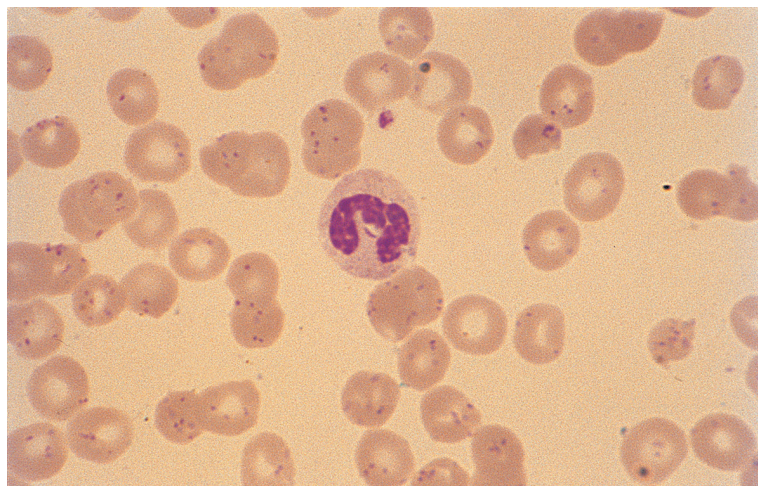


FIGURA 3.176 Distensão sanguínea mostrando múltiplos pequenos bacilos associados aos eritrócitos, em paciente com bartonelose. Há um eritrócito com corpo de Howell-Jolly. Cortesia do falecido Dr. David Swirsky e do falecido Professor Sir John Dacie.

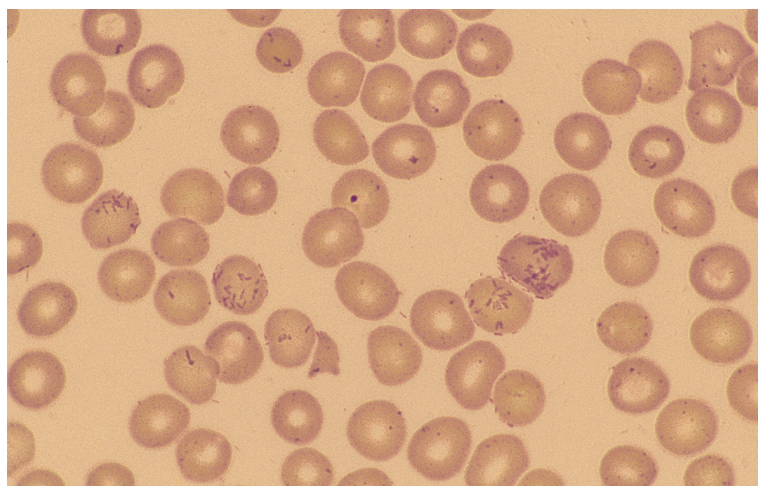


FIGURA 3.177 Distensão sanguínea de paciente hipoesplênico com doença de Whipple, mostrando um fragmento eritrocitário, um eritrócito com corpo de Howell-Jolly e alguns eritrócitos aos quais se associam inúmeros bacilos delicados. Coloração de Wright. Cortesia do Dr. B.J. Patterson, Toronto.

(antes denominada *Ehrlichia phagocytophila* e *E. equi*), os organismos estão nos granulócitos [392]. *Ehrlichia ewingii*, um organismo relacionado estreitamente com a *E. canis*, também afeta o homem e associa-se com mórulas nos granulócitos [392, 393]. Na erliquiose monocítica humana, causada pela *Ehrlichia chaffeensis*, há organismos principalmente em monócitos, mas ocasionalmente em linfócitos (que podem ser atípicos) ou em neutrófilos [394, 395]. Inclusões de *Ehrlichia* ou anaplasma em leucócitos do sangue periférico são mais frequentes na anaplasmoose granulocítica do que na erliquiose monocítica. Casos de erliquiose e anaplasmoose têm sido descritos principalmente nos Estados Unidos, mas a doença também ocorre na Europa [396]. O anaplasma foi descrito nos neutrófilos de um recém-nascido, contaminado por via transplacentária [397]. Na Venezuela, há uma espécie de *Ehrlichia*

que aparece predominantemente em plaquetas e foi detectada em pessoas que tinham contato próximo com cães [398]; em um paciente, havia doença clínica aparente [399].

Bactérias no sangue podem ter aspectos característicos que facilitam a identificação: pelo formato podem ser identificadas como cocos ou bacilos; pela coloração de Gram, como gram-positivas ou gram-negativas. A formação de esporos por *Clostridia* tem sido descrita [400]. O bacilo da peste, *Yersinia pestis* (Figura 3.179), é encontrado extracelularmente, e a bipolaridade pode ser notada às colorações de Romanowsky [401]. *Ehrlichia* e anaplasma têm aspecto característico (ver anteriormente). Bactérias que colonizam cateteres venosos apesar da antibioticoterapia podem ser morfológicamente anormais, tendo aspecto filamentoso em consequência de falha da septação (Figuras 3.180 e 3.181) [381].

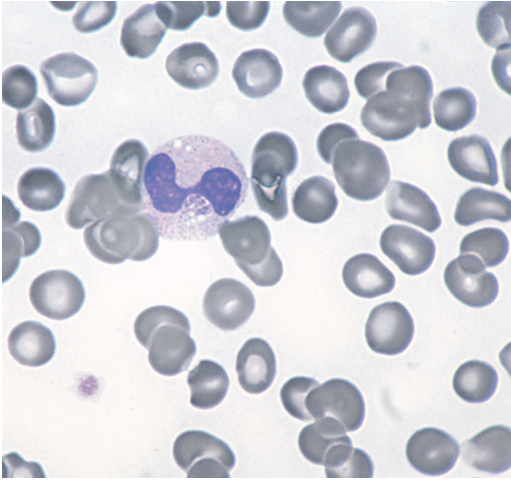


FIGURA 3.178 Distensão sanguínea de paciente com anaplas-mose granulocítica humana, mostrando a forma morular em neutrófilo. Cortesia da Dra. Vandita Johari, Minneapolis.

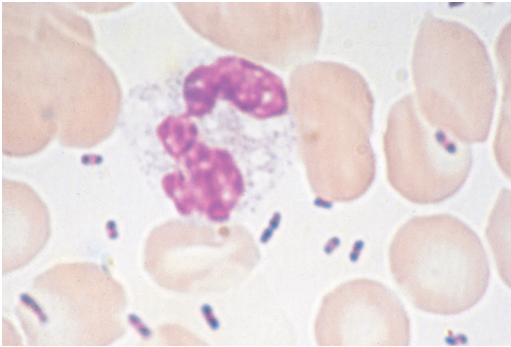


FIGURA 3.179 Distensão sanguínea de paciente com peste, mostrando os bacilos bipolares da *Yersinia pestis*. Cortesia do Banco de Lâminas da American Society of Hematology.

O achado de bactérias em uma distensão de sangue é altamente significativo. Amostras de sangue do cordão constituem exceção, pois frequentemente são colhidas em circunstâncias nas quais a contaminação bacteriana é provável; quando são deixadas à temperatura ambiente e demoram para ser entregues ao laboratório, não é raro que bactérias sejam vistas nas distensões coradas.

Fungos

Fungos também têm sido observados em distensões de sangue periférico, particularmente em pacientes neutropênicos ou com deficiência imunológica, com cateteres venosos implantados. São observados livres, ou dentro de neutrófilos ou monócitos. Fungos que têm sido observados em neutrófilos incluem *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* [402] (Figura 3.182), *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* [403], *Candida krusei* [403], *Candida guilliermondii* [403], *Hansenula anomala* [404], *Histoplasma capsulatum* (Figuras 3.183 e 3.184), *Cryptococcus neoformans* [405], *Penicillium marneffei* (Figura 3.185) [406] e *Rhodotorula glutinis* [403]. Fungos que têm sido notados em monócitos são *Histoplasma capsulatum* e *Penicillium marneffei* [406]. *Malassezia furfur* tem sido notado em posição extracelular [407] e em neutrófilos [408], caracteristicamente em pacientes sob suplementação lipídica intravenosa. *Rhodotorula rubra* também já foi descrita em distensões sanguíneas [403]. Na infecção por *Candida albicans*, observam-se tanto formas de levedura como pseudo-hifas [409]. Em significativa porcentagem de pacientes neutropênicos febris, uma pesquisa cuidadosa na distensão de sangue periférico pode confirmar um diagnóstico de infecção fúngica sistêmica alguns dias antes da positividade das culturas [404].

FIGURA 3.180 *Klebsiella oxytoca* em distensão de sangue obtido de um cateter venoso implantado, mostrando falha de septação: (a) coloração de MGG; (continua)



(a)

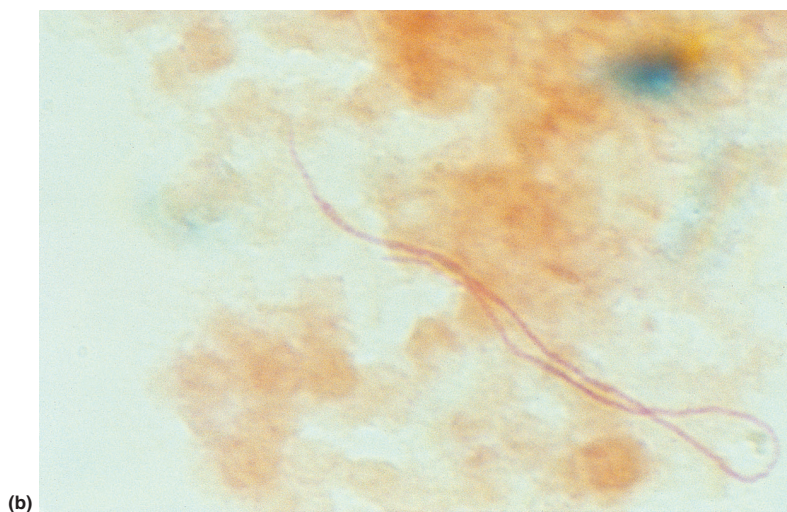


FIGURA 3.180 Continuação (b) coloração de Gram. Cortesia da Dra. Carol Barton e do Sr. J. Kitaruth, Reading.

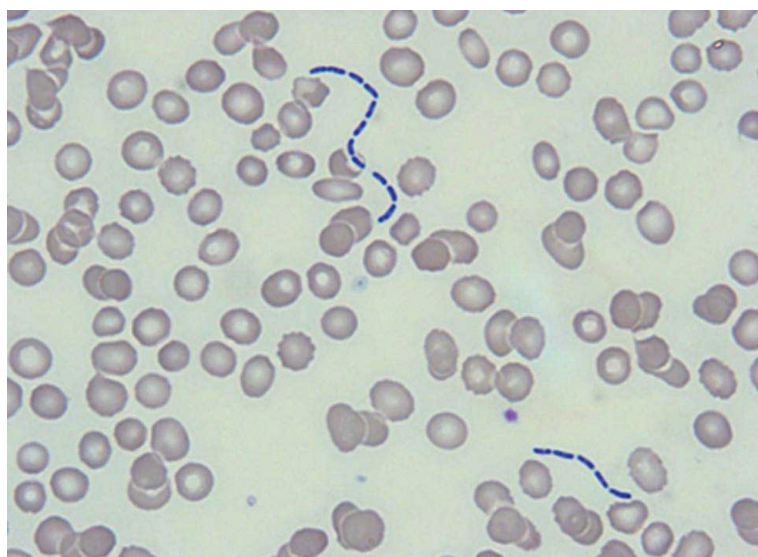


FIGURA 3.181 Distensão sanguínea de paciente com LMA que desenvolveu infecção com *Escherichia coli*. O paciente estava recebendo agentes antifúngicos profiláticos e postulou-se que isso tenha causado a incapacidade dos bacilos se separarem uns dos outros. Cortesia da Dra. Catherine Bagot, Glasgow.

Parasitos

Alguns parasitos, como os da malária e da babesiose, são predominantemente hematozoários, enquanto outros, como as filárias, têm parte do ciclo vital no sangue. Parasitos que podem ser detectados na distensão sanguínea, com a respectiva distribuição geográfica, são relacionados nas Tabelas 3.14 e 3.15.

Malária

Embora os parasitos da malária possam ser detectados em distensões sanguíneas coradas por MGG, as colorações de Leishman e Giemsa, em pH mais alto, facilitam a detecção e a identificação. O exame de gota espessa é preferível para a detecção dos parasitos, e a distensão usual, para a identificação

das espécies. A gota espessa deve ser examinada no mínimo durante 5-10 minutos (200 campos com grande aumento) antes de ser considerada negativa. Quando se dispõe apenas de distensão, esta não deve ser considerada negativa até que seja examinada por 20-40 minutos ou até que tenham sido examinados 200 campos com grande aumento. Diretrizes do Reino Unido requerem que o exame de distensões para malária seja feito por dois observadores. Indivíduos parcialmente imunes costumam ter baixa contagem de parasitos, de modo que a detecção exige um exame demorado. Observadores experientes costumam escanear a distensão com uma objetiva de 50 ×, mas o uso de objetiva 100 × é preferível de modo geral. Em pacientes com forte

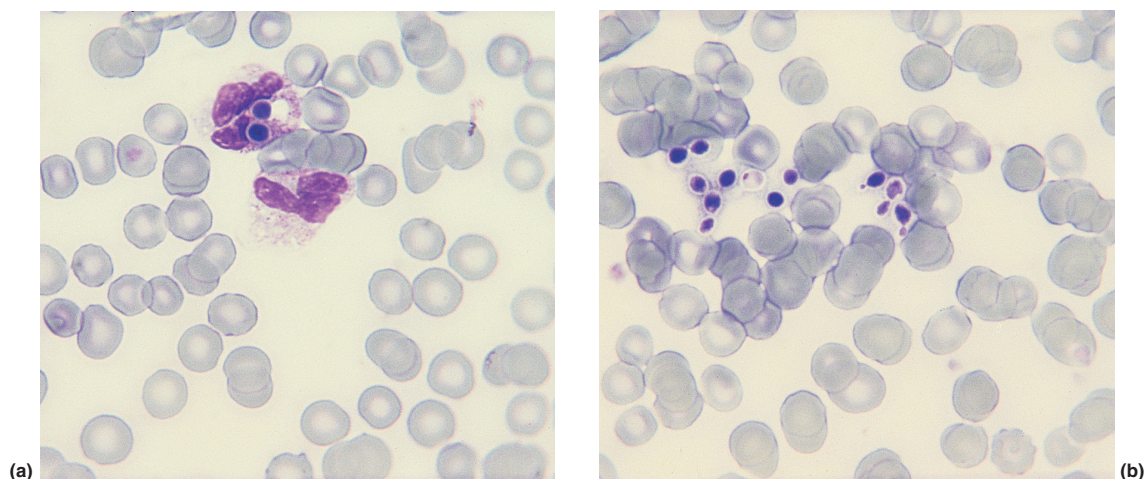


FIGURA 3.182 *Candida parapsilosis* em distensão de sangue periférico: (a) dentro de neutrófilo e (b) livre entre os eritrócitos. Alguns organismos estão com brotações. Cortesia dos Drs. Bipin Vadher e Marilyn Treacy, Londres.

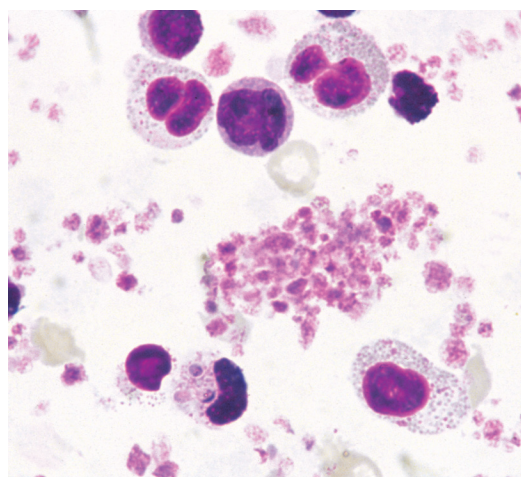


FIGURA 3.183 Um neutrófilo bastonado em distensão de concentrado de leucócitos, mostrando três *Histoplasma capsulatum*. Cortesia da Dra. Sian Lewis, Oxford.

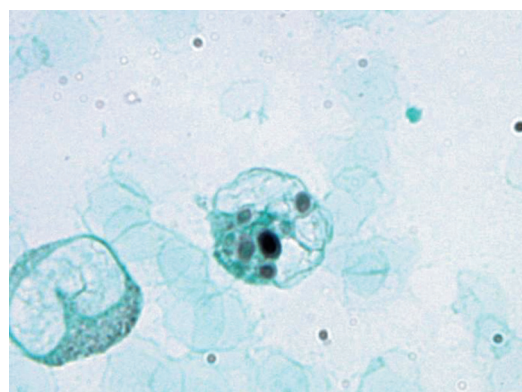


FIGURA 3.184 Coloração com metenamina-prata de *Histoplasma capsulatum* no sangue periférico. Cortesia do Dr. Hector Musa, Minneapolis.

suspeita de malária, com exames iniciais negativos, há necessidade de repetir os exames.

Plasmodium falciparum está associado às mais altas contagens de parasitos, às vezes com 10 a 40% de eritrócitos parasitados. Paradoxalmente, pacientes podem estar gravemente doentes sem que sejam detectados parasitos ao exame de sangue inicial; isso decorre da sequestração dos eritrócitos parasitados nos tecidos. Quando se detecta o *Plasmodium falciparum*, deve-se estimar a porcentagem de células parasitadas para permitir a monitorização do tratamento; gametócitos devem ser excluídos da contagem. Um grátículo de Miller, o

mesmo que se usava para a contagem de reticulócitos, facilita a contagem. Uma contagem de parasitos de mais de 2% em área de baixa transmissão de malária, ou contagem de mais de 5% em zona de transmissão alta e estável, é indicativa de doença grave [413]. Alternativamente, parasitos podem ser contados em gota espessa e seu número, relacionado ao número de leucócitos para se obter uma contagem em número absoluto. Uma falta de diminuição da contagem indica resistência do parasito à medicação. Exsanguinotransfusão ou eritrocitoaférese devem ser consideradas quando a contagem de parasitos é muito alta; os Centers for Disease Control and Prevention nos Estados Unidos recomendam esses métodos quando a contagem exceder 10% [414]. Outros aspectos

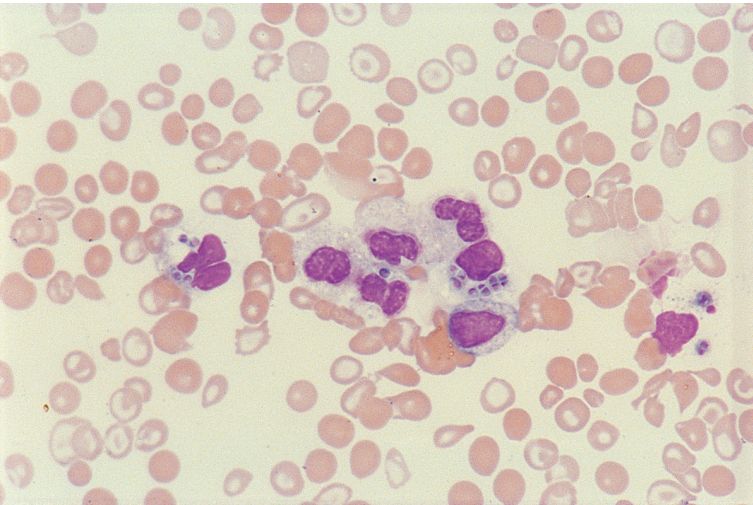


FIGURA 3.185 *Penicillium marneffei* no sangue periférico de um paciente com aids. Cortesia do Dr. K.F. Wong, Hong Kong.

TABELA 3.14 Protozoários que podem ser detectados em distensões de sangue

Parasito	Doença ou nome comum	Distribuição usual
Esporozoários		
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária terça maligna	Amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, particularmente na África
<i>Plasmodium vivax</i>	Malária terça benigna	Amplamente disseminada nos trópicos; também ocorre em algumas zonas temperadas; muito rara nas Áfricas Ocidental e Central
<i>Plasmodium malariae</i>	Malária quartã	Disseminada nos trópicos
<i>Plasmodium ovale</i>	Malária terça benigna	Regiões tropicais da África Ocidental; focos esparsos em outras áreas, incluindo as regiões tropicais da Ásia, a Nova Guiné e o Pacífico Ocidental
<i>Plasmodium knowlesi</i>		Borneo da Malásia [410], Malásia peninsular [411] e, para o norte, até Mianmar; Filipinas, Singapura
<i>Babesia microti</i>	Babesiose	Costa Nordeste dos Estados Unidos; Costa Oeste e Meio-Oeste
<i>Babesia equi</i>	Babesiose	Califórnia
<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	Europa
<i>Toxoplasma gondii</i> [412]	Toxoplasmose	
Hemoflagelados		
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Doença do sono	África Oriental
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Doença do sono	Regiões tropicais das Áfricas Ocidental e Central
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tripanossomíase sul-americana ou doença de Chagas	Ampla área das Américas do Sul e Central
<i>Trypanosoma rangeli</i>	Não patogênico	Américas Central e do Sul
<i>Leishmania donovani</i>	Leishmaniose visceral ou calazar	Índia, China, Ásia Central, África Central e do Norte, Portugal, litoral do Mediterrâneo, Américas Central e do Sul

TABELA 3.15 Nematódeos parasitos (família Filariidae) que podem ser detectados em distensões de sangue

Parasito	Doença ou nome comum	Distribuição usual
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariose – o estágio final pode ser a elefantíase	Amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, particularmente nÁsia, Polinésia, Nova Guiné, África e Américas do Sul e Central
<i>Brugia malayi</i>	Filariose – o estágio final pode ser a elefantíase	Índia, Sudeste da Ásia, China, Japão
<i>Loa loa</i>	Verme ocular ou tumefações de Calabar	Floresta tropical da África Equatorial e sua periferia
<i>Mansonella perstans</i>	Filariose persistente, geralmente não patogênica	Região tropical da África, Américas do Sul e Central
<i>Mansonella ozzardi</i>	Filariose de Ozzard, geralmente não patogênica	Américas do Sul e Central, Antilhas
<i>Onchocerca volvulus</i>	Oncocercose (cegueira dos rios)	Áfricas Ocidental e Central, Sudão, América Central

hematológicos indicativos de malária grave são Hb < 5 g/dL e hemoglobinúria [414].

As características úteis para a distinção entre as quatro espécies de *Plasmodium* são resumidas com texto e desenhos didáticos na Figura 3.186 e ilustradas com fotomicrografias nas Figuras 3.187 a 3.191. *Plasmodium ovale* foi recentemente identificado por genética molecular como consistindo em duas espécies distintas, embora morfologicamente indistinguíveis: *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri* [415]. As quatro espécies principais são encontradas em zonas tropicais e subtropicais. *Plasmodium vivax* é particularmente comum na Índia, no Sri Lanka e no Extremo Oriente. *Plasmodium ovale* é prevalente na África, particularmente África Ocidental, mas também nas Filipinas. Além dessas quatro espécies, a infecção humana com o parasito dos símios, *Plasmodium knowlesi*, inicialmente descrita em Borneo da Malásia (Sabath e Sarawak) e da Indonésia [330], foi ulteriormente referido estender-se à Malásia Peninsular e, depois, a Tailândia e Mianmar [410, 416-420]. Morfologicamente, esse parasito é difícil ou impossível de distinguir do *Plasmodium malariae* e também ocorre confundido com o *Plasmodium falciparum*. Podem haver trofozoítos em anel de tamanho pequeno e médio, algumas vezes formas *acolé**, formas em anel com o núcleo inserido no anel, grânulos de cromatina duplos, formas em bastão compacto, trofozoítos ameboides, esquizontes (contendo até 16 merozoítos) e, em alguns pacientes, gametócitos [421, 422] (Figura 3.191); parasitos maduros contêm pigmento marrom-dourado ou marrom-escuro [421] e neutrófilos podem conter hemozoína [419]. A infecção é assíncrona, mostrando-se presentes, a um tempo, vários estágios do parasito. Os eritrócitos podem conter múltiplos parasitos, não são aumentados de volume e podem mostrar pontilhado fino, mas com menor número de pontos do que na infecção por *P. vivax* e *P. ovale* [421]. É muito comum haver trombocitopenia associada. Em infecções adquiridas na Malásia, deve-se suspeitar de *P. knowlesi* em vez de *P. malariae*, especialmente se houver alta contagem de parasitos em paciente gravemente doente [416]. Há necessidade de análise molecular para confirmação diagnóstica (ver adiante).

Amostras de sangue para pesquisa de malária devem ser imediatamente processadas, pois o armazenamento causa alterações artefatuais nos

parasitos e torna mais difícil a diferenciação entre as espécies. Na infecção por *P. vivax*, esquizontes maduros podem desenvolver-se *in vitro* com reinvasão de eritrócitos por merozoítos; estes podem permanecer na margem dos eritrócitos, levando à confusão com formas *acolé* de *P. falciparum*. Gametócitos de *P. falciparum* podem tornar-se arredondados, causando confusão com *P. malariae*. Gametócitos machos podem perder o flagelo no armazenamento. A parasitemia (em porcentagem) deve ser estimada nas infecções por *P. knowlesi* e *P. falciparum*; na malária por *P. knowlesi*, parasitemia > 1% e contagem de plaquetas < 45.000/μL são indicativos de doença grave [419].

Outras alterações são notadas no hemograma na malária: anemia (com contagem de reticulócitos inapropriadamente baixa), trombocitopenia, linfopenia, linfocitose ou linfócitos atípicos, eosinopenia (com supressão de eosinofilia se preexistente), neutrofilia precoce na infecção por *P. falciparum*, geralmente neutropenia nas demais, monocitose, ocasionalmente merozoítos fagocitados, esquizontes dentro de neutrófilos na infecção por *P. falciparum* com alta parasitemia [423, 424], fagocitose por monócitos de eritrócitos parasitados e não parasitados e pigmento malárico em monócitos, ocasionalmente em neutrófilos. Leucocitose com neutrofilia, linfocitose e monocitose correlacionam-se com a gravidade da malária [424]. Em análise multivariada, leucocitose, linfocitose e monocitopenia correlacionam-se com maior mortalidade [424]. Pigmento malárico em monócitos é mais indicativo de cronicidade da malária do que pigmento em neutrófilos, e correlaciona-se com a gravidade da doença e mortalidade [425]. Trombocitopenia pode ser um aspecto útil à suspeita diagnóstica, alertando o clínico e o laboratorista da possibilidade de malária. Em um trabalho em crianças que consultaram em um Departamento de Acidentes e Emergência, em Londres, um quarto dos pacientes com contagem de plaquetas < 150.000/μL tinha malária [426]; trombocitopenia é notada em casos de malária por *P. falciparum* e *P. vivax*, e é característica da malária por *P. knowlesi* [416]. Um estudo na Índia confirmou que uma contagem de plaquetas < 150.000/μL em malária falcípara e vivax é tão comum como uma contagem de leucócitos < 4.000/μL; o VPM algumas vezes está aumentado [427]. Pigmento malárico em leucócitos é notado principalmente em malária falcípara. O pigmento é hemozoína, um produto de degradação da hemoglobina; pode ser visto facilmente em distensões coradas ou não coradas e é birrefringente à luz polarizada [428]. O pigmento é liberado para o plasma durante a esquizogonia

*N. de T. *Accolé*, em francês no original. Em português, “juntas” ou “lado a lado”

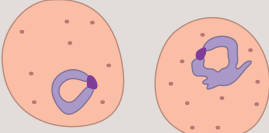
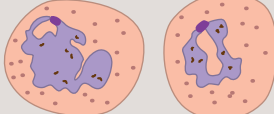
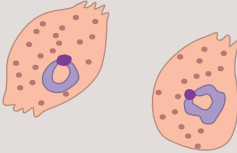
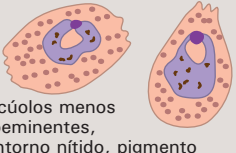
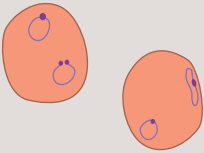
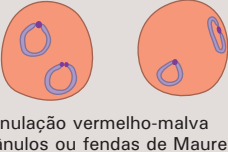
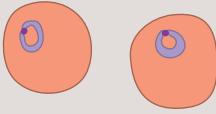




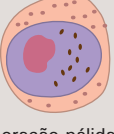










	Características gerais e alterações nos eritrócitos	Trofozoíto jovem (forma em anel)	Trofozoíto maduro
<i>Plasmodium vivax</i>	Eritrócitos de tamanho muito aumentado, irregulares e pálidos, com fina granulação vermelha (grânulos de Schüffner); parasitemia baixa ou moderada; geralmente presentes todos os estágios do ciclo vital; às vezes múltiplos parasitos por célula	Anéis grossos, $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ do diâmetro do eritrócito  Alguns grânulos de Schüffner; formas <i>accolé</i> e grânulos duplos menos comuns do que no <i>P. falciparum</i>	Anéis ameboides $\frac{1}{2}$ – $\frac{2}{3}$ do diâmetro do eritrócito; parasito azul-pálido ou violáceo com vacúolo central proeminente)  Contorno indistinto; grânulos ou bastonetes de pigmento pardo-amarelado disseminados
<i>Plasmodium ovale</i>	Eritrócitos de tamanho aumentado mas não tanto como no <i>P. viva</i> , pálidos, alguns ovais ou piriformes; alguns eritrócitos têm fímbrias em uma ou ambas as extremidades; granulação vermelha de fina a grosseira (grânulos de Schüffner ou de James); é muito incomum mais de um parasito por eritrócito; baixa parasitemia; menos estágios presentes que no <i>P. vivax</i>	Anéis grossos, compactos, $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ do diâmetro do eritrócito  Numerosos grânulos de Schüffner, mais pálidos que no <i>P. vivax</i>	Anéis grossos, menos irregulares que no <i>P. vivax</i> , $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ do diâmetro do eritrócito  Vacúolos menos proeminentes, contorno nítido, pigmento pardo-amarelado mais grosseiro e escuro que no <i>P. vivax</i> ; granulação de Schüffner proeminente
<i>Plasmodium falciparum</i>	Eritrócitos de tamanho e coloração inalterados, salvo, às vezes, alguns descorados; múltiplos parasitos por eritrócito e intensa parasitemia (10-40% dos eritrócitos); frequentemente só formas em anel	Anéis delicados, $\frac{1}{6}$ – $\frac{1}{4}$ do diâmetro do eritrócito  Grânulos duplos e formas <i>accolé</i> comuns	Anéis de espessura média, $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ do diâmetro do eritrócito  Granulação vermelho-malva (grânulos ou fendas de Maurer) pode estar presente; formas em anel são mais frequentes do que trofozoítos maduros; o citoplasma pode ser vacuolizado
<i>Plasmodium malariae</i>	Eritrócitos de tamanho normal ou contraídos; coloração inalterada; o menor grau de parasitemia; é rara a presença de mais de um parasito por eritrócito; pontilhado ausente, salvo em distensões excessivamente coradas; geralmente presentes todos os estágios	Anéis pequenos, grossos, compactos; pequeno grânulo de cromatina que pode estar dentro do anel  Grânulos duplos ou formas <i>accolé</i> são raros	Forma amebóide mais compacta que no <i>P. vivax</i> ; às vezes formas angulares ou em bastão  Pigmento pardo-amarelado escuro abundante; pontilhado ausente, salvo quando a coloração é excessiva

FIGURA 3.186 Características úteis na diferenciação das várias espécies de parasitos da malária. (continua)

Esquizonte jovem	Esquizonte tardio	Gametócito	
		Macrogametócito	Microgametócito
<p>Redondo ou irregular; ameboide; massa central frouxa de pigmento pardo-amarelado</p>  <p>O esquizonte quase enche o eritrócito; granulação de Schüffner</p>	<p>12-24 (geralmente 16-24) merozoítos de tamanho médio; 1-2 grumos de pigmento periférico</p>  <p>O esquizonte quase enche o eritrócito; granulação de Schüffner</p>	<p>Redondo ou ovoide, quase enche o eritrócito de tamanho aumentado; citoplasma azul</p>  <p>Núcleo compacto, excêntrico, vermelho; pigmento disseminado</p>	<p>Redondo ou ovoide, quase do tamanho de um eritócito normal, mas não enche o eritrócito aumentado</p>  <p>De coloração pálida; núcleo maior, vermelho mais claro, central ou excêntrico; pigmento fino, disseminado</p>
<p>Redondo compacto; pigmento pardo-escuro, mais denso e grosseiro que o do <i>P. vivax</i></p>  <p>Granulação de Schüffner</p>	<p>6-12 (usualmente 8) merozoítos grandes, dispostos irregularmente como um cacho de uvas</p>  <p>Pigmento central; granulação de Schüffner</p>	<p>Similar ao <i>P. vivax</i>, mas um pouco menor</p>  <p>Pigmento mais grosseiro e mais escuro, disseminado mas predominante na periferia</p>	<p>Similar ao <i>P. vivax</i>, mas um pouco menor</p>  <p></p>
<p>Não costuma ser visto no sangue</p> <p>Muito pequeno, ameboide; pigmento disseminado de pardo-claro a negro</p>	<p>Não costuma ser visto no sangue</p> <p>8-32 (geralmente poucos) merozoítos muito pequenos, agrupados irregularmente; grumo periférico de pigmento grosseiro, pardo-escuro</p>	<p>Em formato de foicinha ou crescente; deforma o eritrócito que aparenta estar vazio de hemoglobina</p>  <p>Citoplasma azul; núcleo compacto central com pigmento agregado ao redor</p>	<p>Oval ou em crescente, com extremidades rombas; de cor azul-pálida ou rósea</p>  <p>Núcleo pálido grande, com pigmento mais disseminado do que o macrogametócito</p>
<p>Compacto, redondo, enche o eritrócito</p>  <p>Pigmento denso, pardo-escuro</p>	<p>6 a 12 (geralmente 8 a 10) merozoítos grandes, disposição simétrica, em roseta ou margarida</p>  <p>Pigmento central, denso, pardo-escuro</p>	<p>Similar ao <i>P. vivax</i>, mas um pouco menor, redondo ou oval, quase enchendo o eritrócito, azul com núcleo escuro</p>  <p>Pigmento proeminente, concentrado no centro e na periferia</p>	<p>Similar ao <i>P. vivax</i>, mas um pouco menor, cor-de-rosa ou azul mais claro que o macrogametócito, com núcleo maior e mais pálido</p>  <p>Pigmento proeminente</p>

(b)

FIGURA 3.186 continuação

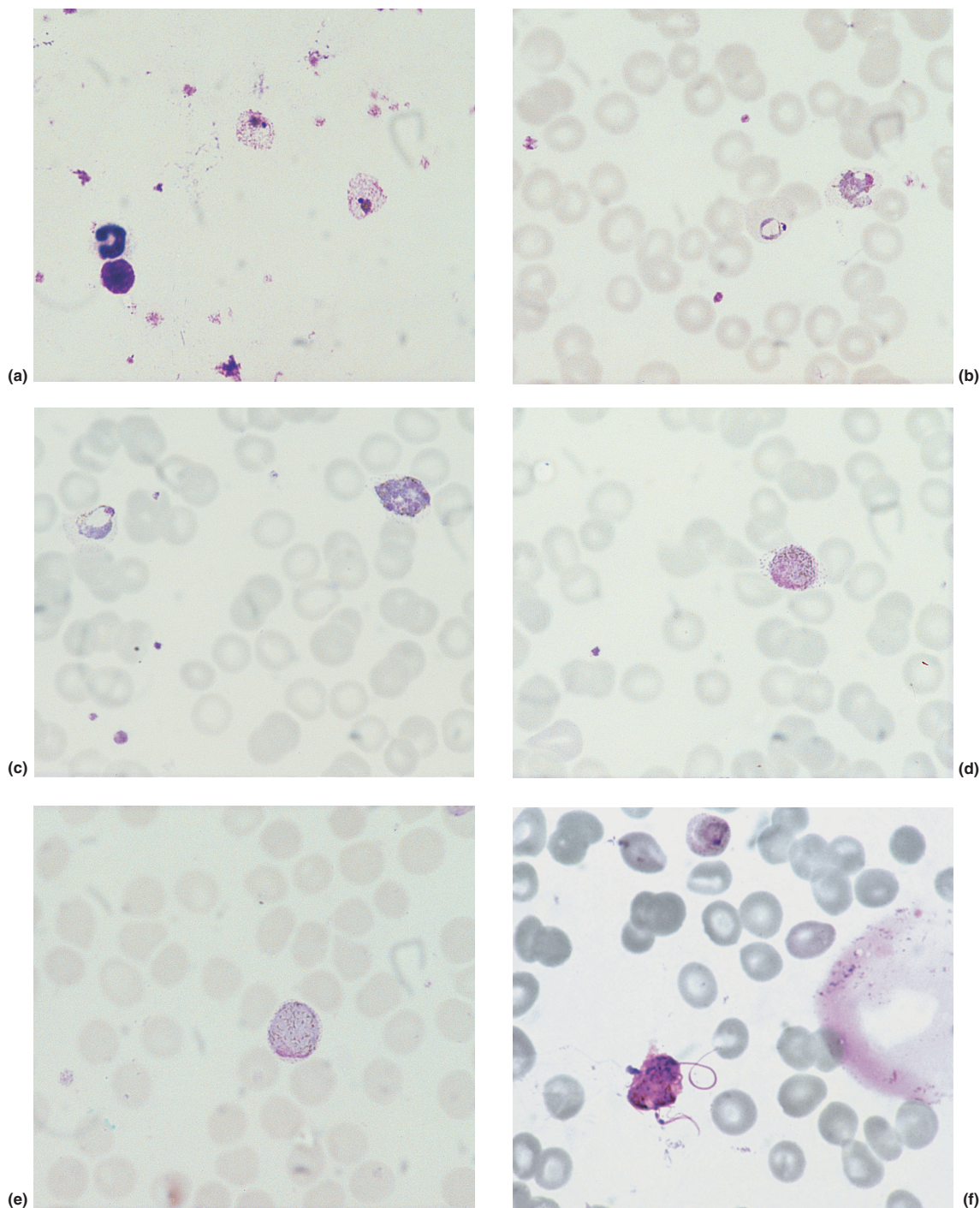


FIGURA 3.187 Estágios do ciclo vital do *Plasmodium vivax*, em gota espessa (a) e distensões (b-h) de sangue periférico, com coloração de Giemsa: (a) duas formas em anel dentro de estromas de eritrócitos; (b) uma forma em anel e um trofozoíto ameboide – os dois eritrócitos parasitados têm volume aumentado, são descorados e contêm tênues grânulos de Schüffner; (c) uma forma em anel e um esquizonte inicial, contendo duas massas de cromatina – os dois eritrócitos parasitados são descorados e contêm tênues grânulos de Schüffner; (d) um microgametócito – o pigmento é fino e disseminado, e o parasito não enche completamente o eritrócito; (e) um macrogametócito – o pigmento é fino e disseminado, e o parasito enche completamente o eritrócito, que é maior do que os eritrócitos não parasitados; (f) exflagelação de microgametas de um gametócito – este estágio do ciclo vital geralmente ocorre no estômago do mosquito; (*continua*)

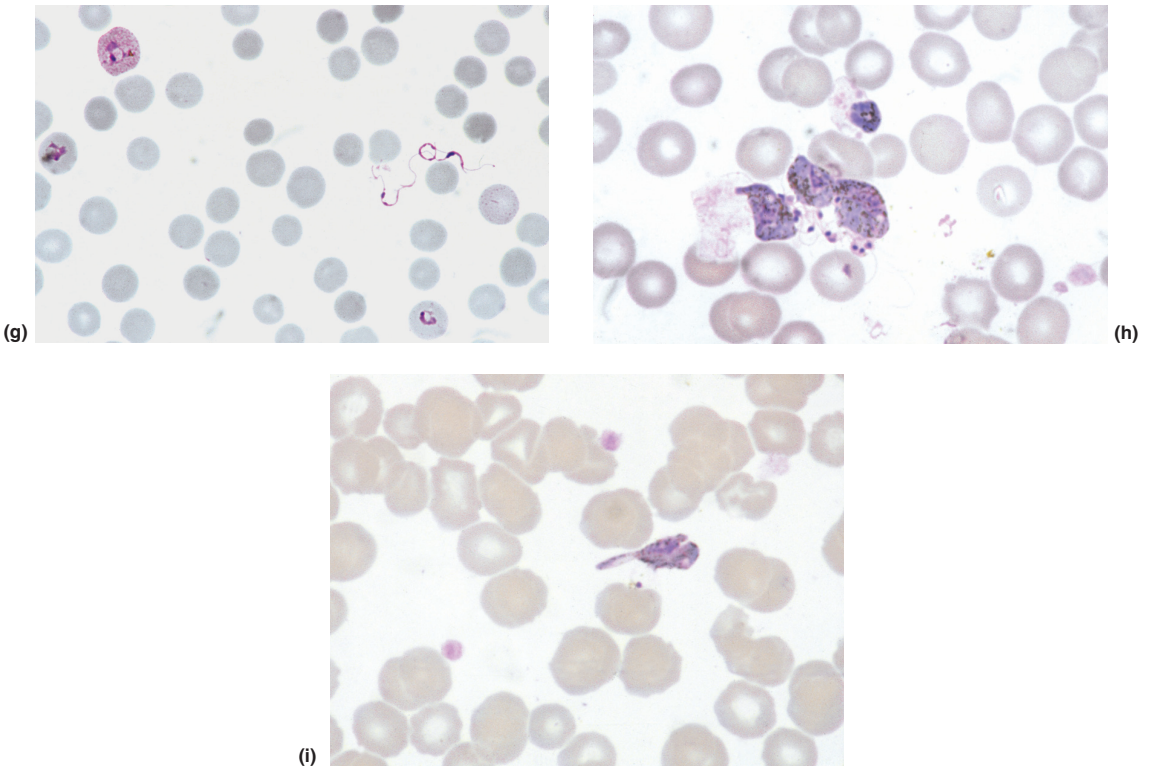


FIGURA 3.187 (Continuação) (g) microgametos – este estágio geralmente ocorre no estômago do mosquito; (h) microgametos agrupados em torno de três gametócitos – parece que um microgametócito fertilizou um gametócito, já que o núcleo parece haver penetrado o gametócito – este estágio do ciclo vital do parasito geralmente ocorre no estômago do mosquito; (i) oocineto – este estágio ocorre no estômago do mosquito e é visto muito raramente no sangue periférico humano. Cortesia da Dra. Wendy Bailey, Liverpool.

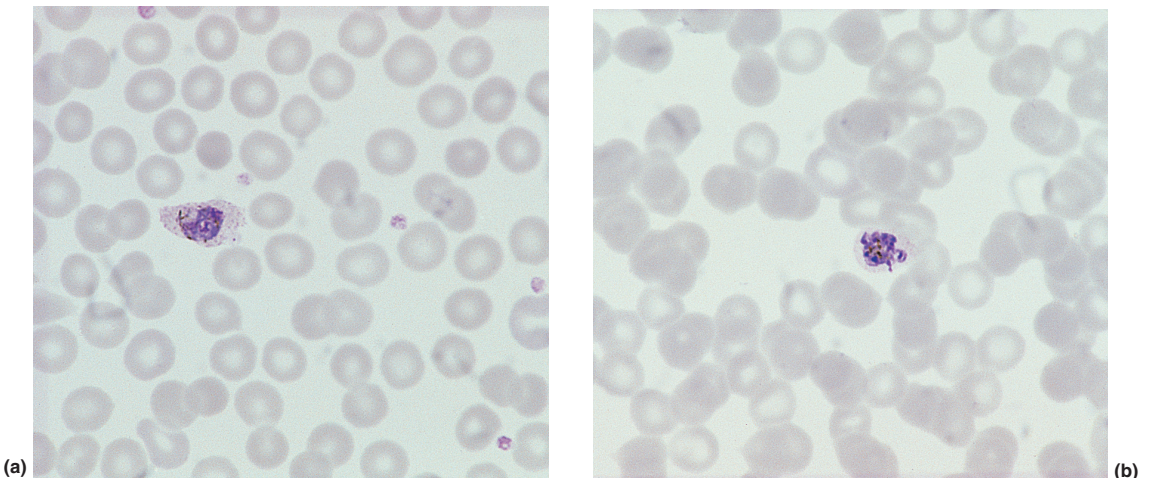


FIGURA 3.188 Estágios do ciclo vital do *Plasmodium ovale*, em distensões coradas com Giemsa: (a) trofozoíto tardio em um eritrócito oval, descorado e aumentado de tamanho, com uma extremidade fimbriada – o pigmento é mais grosseiro e mais escuro do que o do *Plasmodium vivax*, o parasito é mais compacto e os grânulos de Schüffner são mais proeminentes; (b) esquizonte contendo oito merozoítos – o pigmento grosseiro acumula-se centralmente.

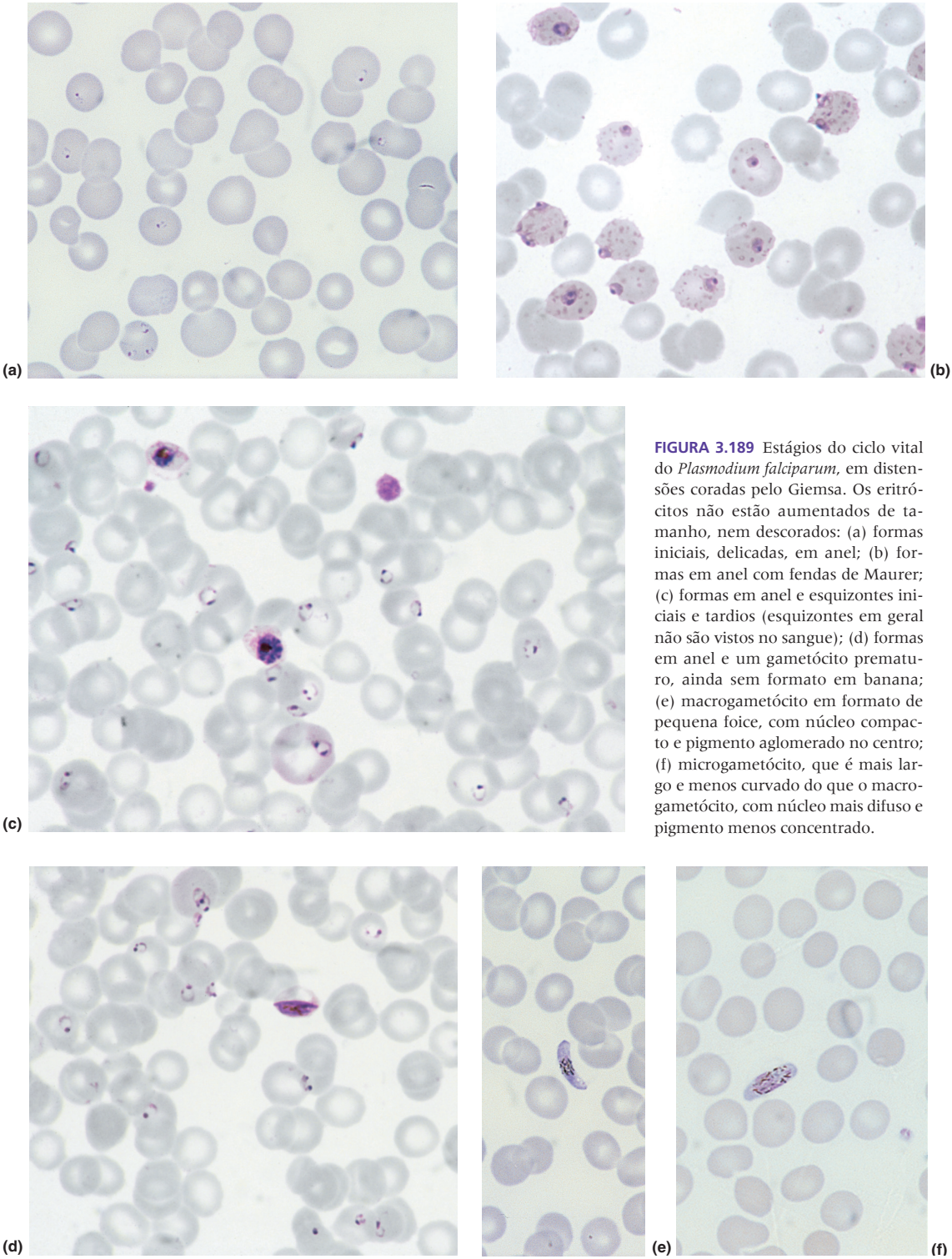


FIGURA 3.189 Estágios do ciclo vital do *Plasmodium falciparum*, em distensões coradas pelo Giemsa. Os eritrócitos não estão aumentados de tamanho, nem descorados: (a) formas iniciais, delicadas, em anel; (b) formas em anel com fendas de Maurer; (c) formas em anel e esquizontes iniciais e tardios (esquizontes em geral não são vistos no sangue); (d) formas em anel e um gametócito prematuro, ainda sem formato em banana; (e) macrogametócito em formato de pequena foice, com núcleo compacto e pigmento aglomerado no centro; (f) microgametócito, que é mais largo e menos curvado do que o macrogametócito, com núcleo mais difuso e pigmento menos concentrado.

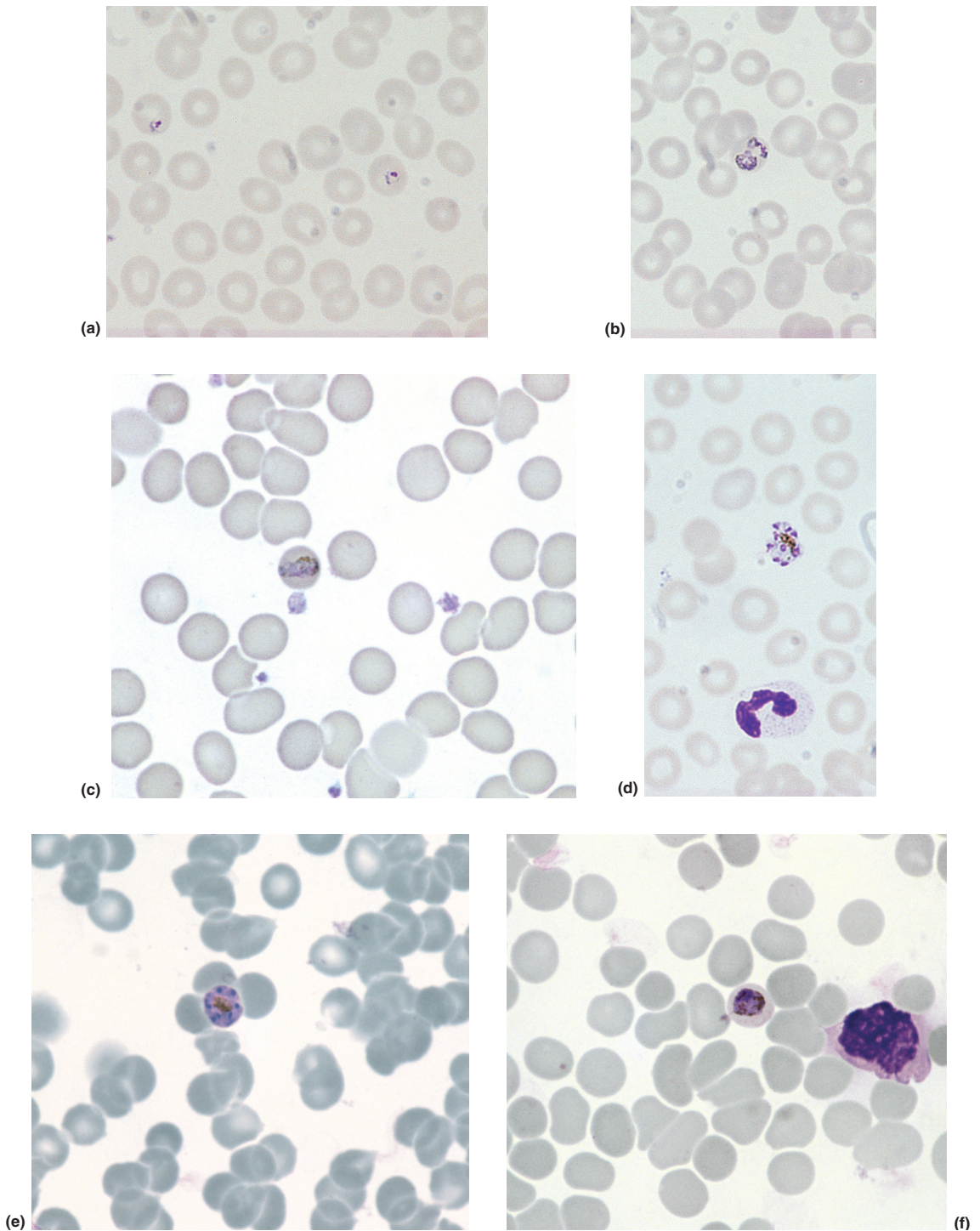


FIGURA 3.190 Estágios do ciclo vital do *Plasmodium malariae*, em distensões coradas pelo Giemsa. Os eritrócitos não estão aumentados de tamanho, nem descorados; (a) formas iniciais em anel, que são pequenas, mas menos delicadas do que as do *Plasmodium falciparum*; um parasito tem um ponto de cromatina dentro do anel; (b) trofozoíto ameboide com pigmento castanho-escuro grosseiro; (c) trofozoíto em bastão; (d) esquizonte com cerca de 7 merozoítos dispostos como pétalas de margarida, com pigmento castanho, imperfeito, central; (e) esquizonte com merozoítos agrupados ao redor do pigmento, localizado centralmente; (f) um gametócito e um linfócito reacional.

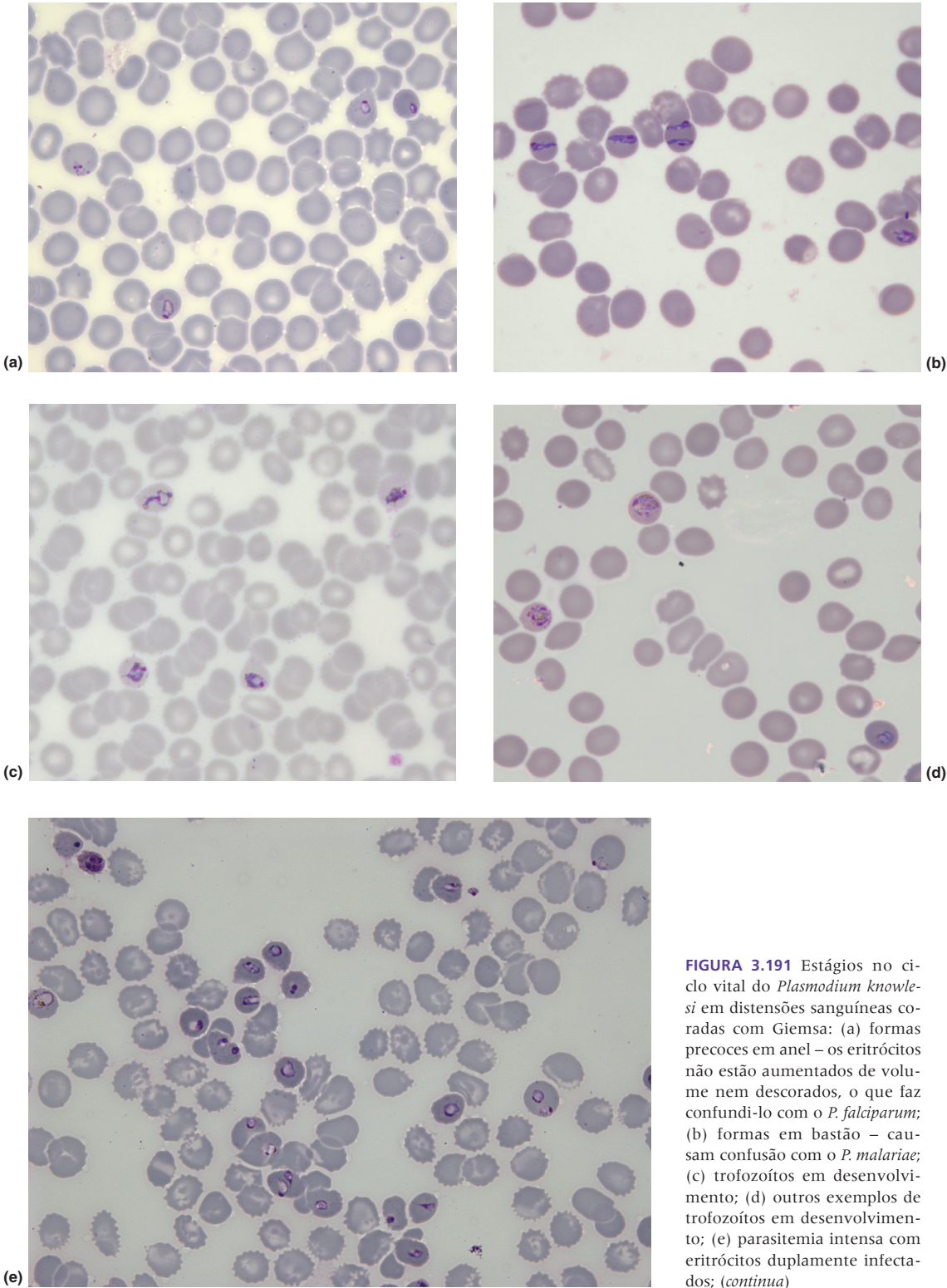
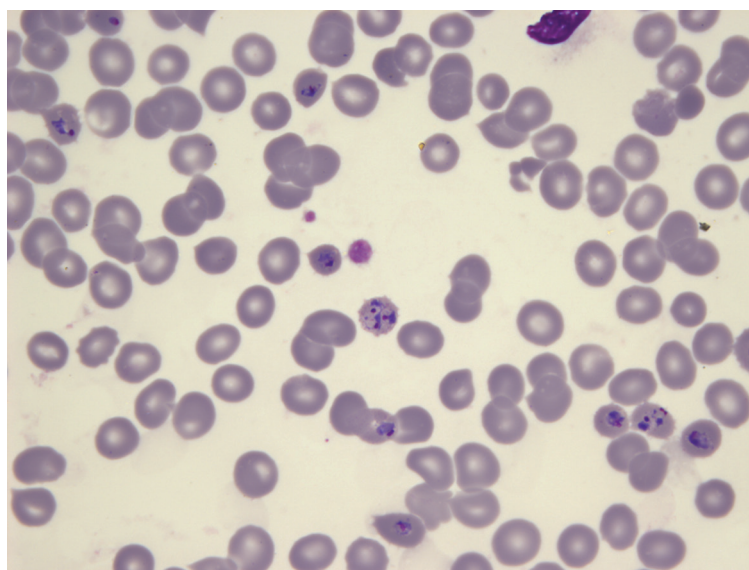
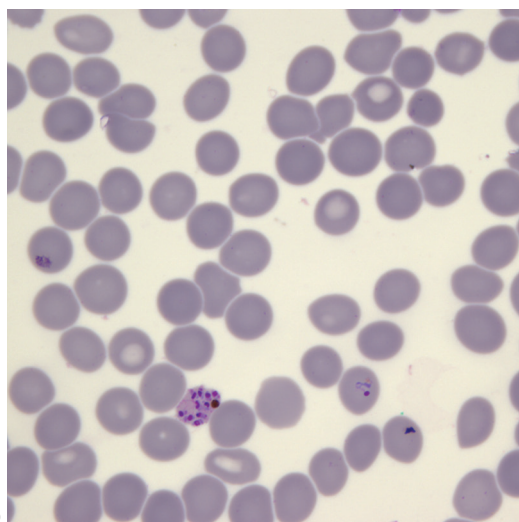


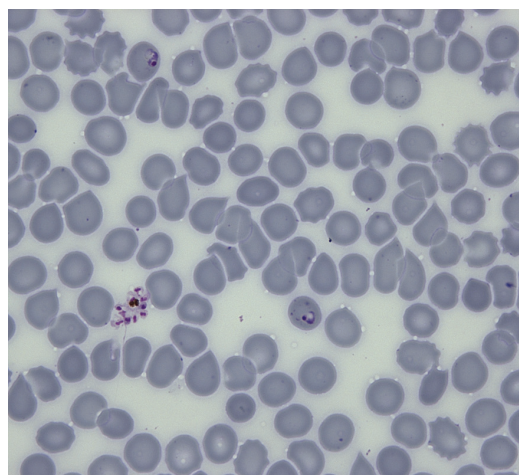
FIGURA 3.191 Estágios no ciclo vital do *Plasmodium knowlesi* em distensões sanguíneas coradas com Giemsa: (a) formas precoces em anel – os eritrócitos não estão aumentados de volume nem descorados, o que faz confundi-lo com o *P. falciparum*; (b) formas em bastão – causam confusão com o *P. malariae*; (c) trofozoítos em desenvolvimento; (d) outros exemplos de trofozoítos em desenvolvimento; (e) parasitemia intensa com eritrócitos duplamente infectados; (*continua*)



(f)



(g)



(h)

FIGURA 3.191 Continuação (f) parasitemia intensa com eritrócitos dupla e triplamente infectados; (g) uma forma em anel e um esquizonte rompido contendo 10 merozoítos e pigmento; (h) uma forma em anel e um esquizonte rompido composto por 8 merozoítos, com pigmento. Cortesia da Dra. Janet Cox-Singh, St. Andrews.

[423] e, então, fagocitado, de modo que a porcentagem de leucócitos com pigmento reflete a carga de parasitos sequestrados e tem significação prognóstica [423]. Monócitos contendo pigmento persistem no sangue por vários dias após o desaparecimento de eritrócitos parasitados, o que pode permitir um diagnóstico retrospectivo de malária [429].

Os histogramas e *scatter plots* dos contadores automatizados podem mostrar alterações na presença de parasitos da malária. Isso foi notado com vários modelos Coulter, Sysmex, Cell-Dyn e Mindray (ver Capítulo 2). A presença de parasitos da malária pode ocasionar pseudoeosinofilia com instrumentos Sysmex devido à despolarização da luz pela hemozoína.

Outros testes para malária

Já estão comercialmente disponíveis testes para diagnóstico imunológico de malária. Há tiras para detecção imunocromatográfica tanto de um antígeno do *P. falciparum*, proteína-2 rica em histidina, como desidrogenase láctica parasítica (pLDH) [430] ou aldolase parasítica [431]. A pLDH pode ser espécie-específica, identificando *P. falciparum* ou *P. vivax*, ou pan-específica [432]. A aldolase parasítica é pan-específica [432]. As tiras para detecção de pLDH são sensíveis e específicas para *P. falciparum* e sensíveis para *P. vivax*; entretanto, só cerca de metade dos casos de infecção por *P. ovale* e *P. malariae* [433], e cerca de três quartos de infecções por *P. knowlesi* [431], são detectados. Apenas um quarto das infecções por *P. knowlesi* é detectado usando um teste de aldoses [431]. Testes para proteína-2 rica em histidina persistem positivos por algum tempo após a infecção aguda, enquanto a positividade para pLDH correlaciona-se com a presença de organismos viáveis e pode dar uma pista para infecção resistente à droga. Resultados falsamente positivos com kits para detecção de proteína-2 rica em histidina podem ocorrer em pacientes com artrite reumatoide [434]. Atualmente, já há no comércio um número grande de testes para diagnóstico rápido. A OMS avaliou-os individualmente: <http://www.wpro.who.int/sites/rdt> e www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports_brochures/malaria-diagnostic-test-report.html.

A infecção por *P. knowlesi* pode ser diagnosticada por uma reação em cadeia da polimerase (*nested PCR*) [416].

Babesiose

A babesiose é uma doença parasitária incomum [435], transmitida por carrapatos, que pode ser facilmente confundida com a malária. *Babesia microti* é endêmica no sul da Nova Inglaterra e do estado de Nova Iorque, em Wisconsin e Minnesota. Adultos saudáveis e imunologicamente normais em geral são assintomáticos [436]; a infecção pode persistir por meses ou até anos [436]. *Babesia duncani* ocorre na costa oeste dos Estados Unidos [437]. Infecção por *Babesia divergens* ocorre esporadicamente nos Estados Unidos [438], na Europa (incluindo a Irlanda) e na Ásia. Cerca de 30 casos foram descritos na Europa, mais de três quartas partes em pacientes hipoesplênicos [439], mas é provável que casos benignos da doença em pacientes com baços funcionantes não sejam detectados [440]. Infecção por *Babesia bovis* também ocorre na Europa [441]. Os trofozoítos de *Babesia* são anéis pequenos, semelhantes aos do *Plasmodium falciparum*, de 1-5 µm de diâmetro, com dois ou três pontos de cromatina e citoplasma escasso. Às vezes, são piriformes (formato de pera) e pareados (Figura 3.192a), ou então as extremidades pontiagudas de quatro parasitos estão em contato, formando uma cruz de Malta (Figura 3.192b). Algumas vezes, são vistos parasitos extracelulares [442], que podem dispor-se em conglomerados [441]. *Babesia microti* e *Babesia duncani* estão associadas com formas em cruz de Malta e anéis pleomórficos, neste último caso com vacúolos citoplasmáticos grandes ou pequenos [430, 437]. *Babesia divergens* e *Babesia venatorum* tipicamente mostram-se como merozoítos piriformes pareados e raramente como tétrades

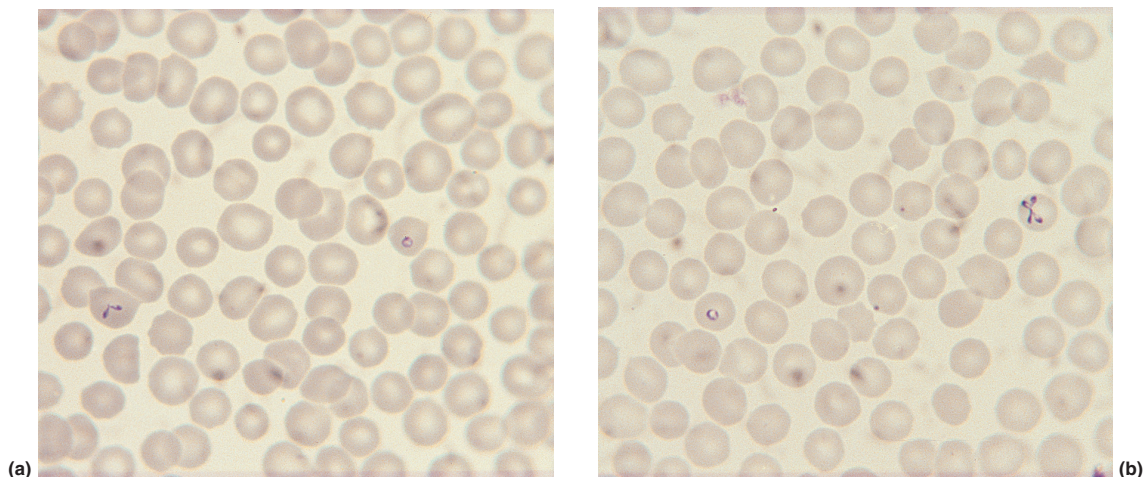


FIGURA 3.192 Distensão sanguínea de um macaco esplenectomizado, parasitado por *Babesia microti*: (a) uma única forma em anel e um par de parasitos piriformes; (b) uma única forma em anel e quatro parasitos piriformes, formando uma tétrade ou cruz de Malta. Cortesia do Sr. John Williams, Londres.

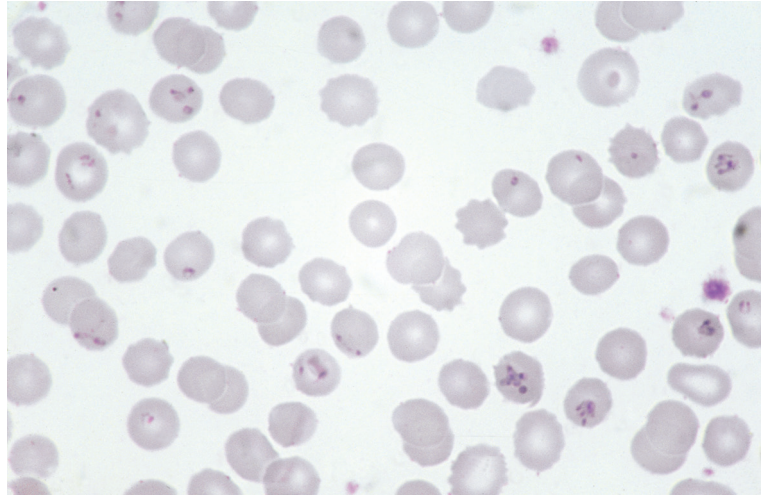


FIGURA 3.193 Distensão sanguínea de paciente com babesiose causada por *Babesia divergens*, mostrando numerosos parasitos, inclusive uma cruz de Malta e pares piriformes. Cortesia do Sr. C. Murphy, Cork.

[430]. Na infecção por *Babesia divergens*, os pares piriformes localizam-se geralmente na periferia do eritrócito [430]. A presença de múltiplas formas em anel, até quatro por célula, diz-se ser patognomônica de babesiose [453]. As formas em anel das espécies de *Babesia* podem ser até menores das que as do *P. falciparum* (Figura 3.193); este fato, juntamente com a vacuolização do parasito, o pleomorfismo das formas em anel, a presença extracelular de trofozoítos e a ausência de hemozoína (pigmento malarico), facilita a diferenciação. A babesiose ocorre particularmente, mas não de maneira exclusiva, em indivíduos hipoesplênicos, nos quais 25% ou mais dos eritrócitos podem estar parasitados. Em pacientes com baço funcionante, o nível de parasitemia em geral é baixo; em pacientes HIV-positivos e imunossuprimidos ocorrem infecções mais graves [442]. O método de detecção, como no caso da malária, é o exame de gota espessa e de distensões de sangue. Com frequência, há trombocitopenia associada; às vezes, neutropenia [436].

Outros exames

A babesiose pode ser diagnosticada sorologicamente (embora com reatividade cruzada com a malária) e por reação em cadeia da polimerase (PCR) [442].

Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* tem sido raramente identificado no sangue periférico de pacientes com toxoplasmose e uma imunodeficiência subjacente [444, 445]. Os parasitos podem ser extracelulares ou estar dentro de neutrófilos.

Infecção por hemoflagelados

As características morfológicas dos hemoflagelados que podem ser encontrados no sangue periférico são resumidas com texto e desenhos didáticos na Figura 3.194. Tripanossomos podem ser vistos no sangue periférico como parasitos extracelulares móveis [446]. Eles têm um corpo delgado e movem-se por meio de um flagelo que se estende do cinetoplasto, na extremidade posterior do parasito, à extremidade anterior, onde o flagelo é livre (Figuras 3.195 e 3.196); o flagelo une-se ao corpo por uma membrana ondulante. Pode-se ver o parasito movendo-se, em preparação a fresco, colocando-se uma gota de sangue anticoagulado entre lâmina e lamínula. Os parasitos também podem ser detectados em preparações fixadas e coradas, sejam elas gotas espessas, distensões de sangue ou de camada de leucócitos (*buffy coat*). Quando há poucos parasitos, é mais fácil detectá-los pelo exame do sedimento de 10 a 20 mL de sangue hemolisado. O *Trypanosoma brucei rhodesiense* e o *Trypanosoma brucei gambiense* (ver Figura 3.193) são morfológicamente idênticos, mas sua distribuição geográfica difere (ver Tabela 3.14). O *T. brucei rhodesiense* é o mais facilmente visto em distensões de sangue periférico. No caso do *T. brucei gambiense*, são necessárias técnicas de concentração; se, mesmo assim, não forem detectados parasitos no sangue, será necessária punção de linfonodo para o diagnóstico. Pacientes com tripanossomíase muitas vezes têm anemia normocrômica e normocítica e trombocitopenia [447].

<p><i>Trypanosoma rhodesiense</i> e <i>Trypanosoma gambiense</i></p> <p>As duas espécies são morfológicamente idênticas; extracelulares; comprimento de 8 a 30 µm; polimórficas, variando de longas e delgadas, com um flagelo livre, a curtas e rombas, com um flagelo abreviado; serpentiformes; cinetoplasto pequeno; extremidade anterior pontiaguda flagelada, posterior romba</p>	
<p><i>Trypanosoma cruzi</i></p> <p>Extracelular; comprimento de 20 a 25 µm; mais uniforme na morfologia do que as espécies africanas, com um cinetoplasto maior e uma membrana ondulante menos sinuosa; em formato de "S" ou "U"; às vezes, com ambas as extremidades pontiagudas</p>	
<p><i>Trypanosoma rangeli</i></p> <p>Extracelular; mais longo e mais delgado do que o <i>T. cruzi</i>, com um cinetoplasto menor e uma membrana ondulante mais sinuosa; núcleo mais anterior, ao passo que o do <i>T. cruzi</i> é central</p>	
<p><i>Leishmania donovani</i></p> <p>Parasito dentro de monócitos; tamanho razoavelmente uniforme; aproximadamente 2-6 × 1-3 µm; contém um núcleo e um cinetoplasto em formato de bastão</p>	

FIGURA 3.194 Resumo das características morfológicas dos hemoflagelados.

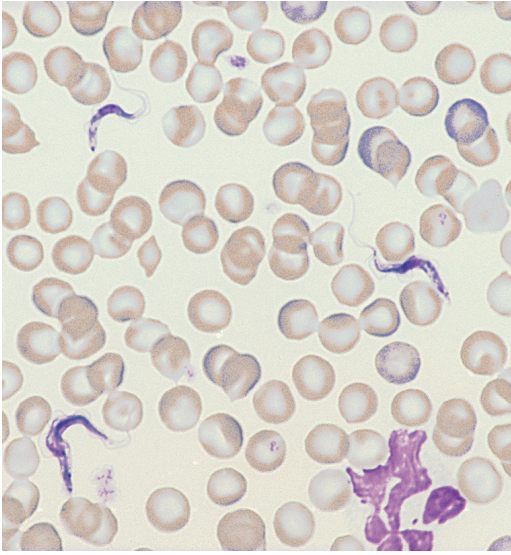


FIGURA 3.195 *Trypanosoma brucei gambiense*; os parasitos são serpentiformes, com cinetoplasto pequeno (objetiva 40 ×).

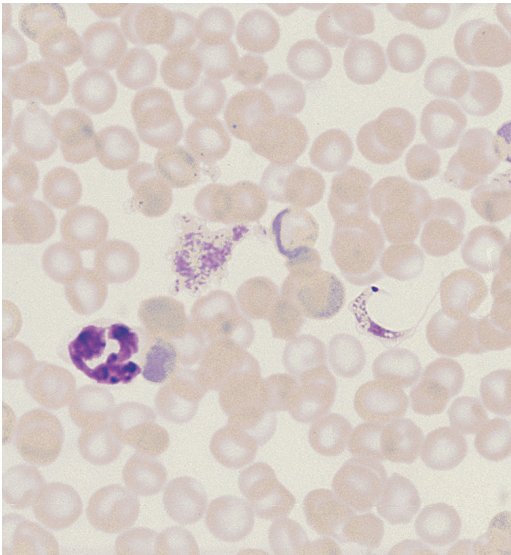


FIGURA 3.196 *Trypanosoma cruzi*; o parasito é curvo, mas não serpentiforme, e tem um cinetoplasto grande (objetiva 40 ×).

Trypanosoma evansi, um parasito de mamíferos domesticados, foi descrito na Índia em um paciente humano com suscetibilidade genética [448].

Trypanosoma cruzi (ver Figura 3.196; ver também a Figura 2.6), agente causal da doença de

Chagas, difere morfologicamente dos parasitos africanos. Ele raramente é detectado no exame direto do sangue, sendo necessários procedimentos de concentração; o exame a fresco de um concentrado de leucócitos, à procura do parasito móvel, pode ser útil. Distribui-se principalmente pela América Latina e no sul dos Estados Unidos, mas pode ocorrer em áreas não endêmicas, como na Espanha e em outros pontos dos Estados Unidos, pela migração. A morfologia é suficiente para distingui-lo do *Trypanosoma rangeli*, não patogênico, que tem distribuição geográfica semelhante (ver Figura 3.169). Na fase aguda da doença de Chagas, o hemograma pode mostrar linfocitose e discreta anemia.

Leishmania donovani, causadora do calazar, pode raramente ser vista nos monócitos ou nos neutrófilos do sangue periférico, em gota espessa, distensões ou preparações da camada de leucócitos (Figura 3.197). O exame cuidadoso de uma distensão de sangue pode tornar desnecessária uma punção da medula óssea ou do baço, mas esses procedimentos dão muito mais sensibilidade à pesquisa do que o exame do sangue periférico. Culturas do sangue e da medula são ainda mais sensíveis do que a microscopia. Outras alterações hematológicas que podem ser notadas nos pacientes com calazar são anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e exagero na formação de *rouleaux*. Podem formar-se crioglobulinas e, inclusive, paraproteínas.

Outros exames

Há métodos imunológicos rápidos para detecção de antígenos de *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* [430] e para *T. cruzi*. Diversos testes imunológicos sensíveis também são comercializados para o diagnóstico de leishmaniose.

Filariose

Na filariose, os vermes adultos residem nos tecidos e liberam microfílarias na corrente sanguínea. As microfílarias podem ser detectadas durante a fase aguda da doença, mas não em pacientes com dano tecidual crônico sem doença ativa. Como as microfílarias são móveis, o exame de preparação a fresco é recomendado, embora elas possam ser detectadas em gota espessa e distensões. Podem ser necessários exames repetidos, e as amostras de sangue devem ser colhidas no momento propício para o achado

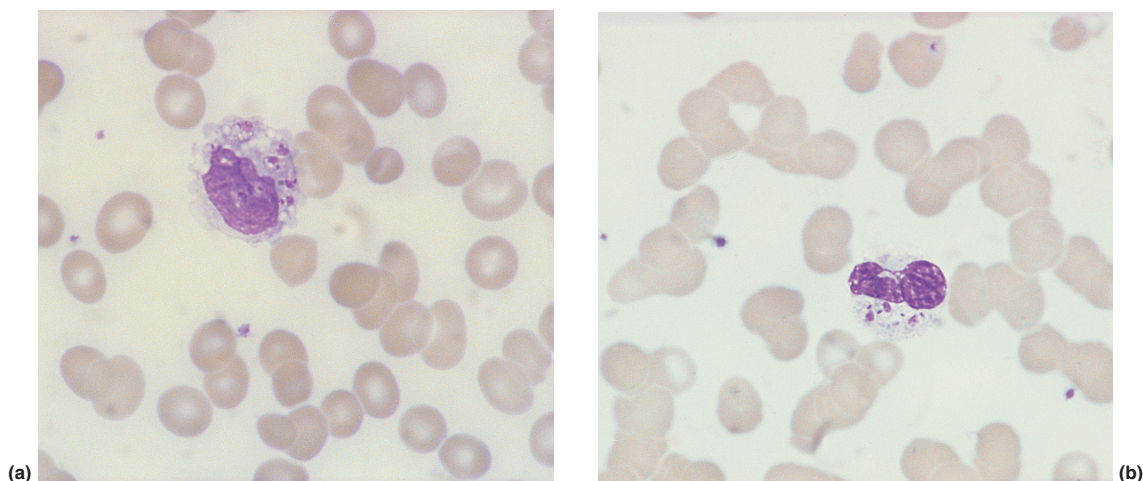


FIGURA 3.197 *Leishmania donovani* em: (a) um monócito; e (b) um neutrófilo no sangue periférico de paciente com aids.

das espécies: a *Wuchereria bancrofti** e a *Brugia malayi* liberam suas microfilárias à noite, ao passo que as da *Loa loa* são liberadas durante o dia. A *Mansonella ozzardi* é aperiódica; como vive nos capilares cutâneos, é mais fácil encontrá-la no sangue capilar [347]. A *Mansonella perstans* é em geral aperiódica, mas a liberação noturna é mais frequente.

As características morfológicas úteis na diferenciação das diversas microfilárias são resumidas com texto e desenhos didáticos na Figura 3.198 e ilustradas com fotomicrografias nas Figuras 3.199 a 3.202. De um modo geral, as filárias patogênicas têm uma bainha, as não-patogênicas, não têm. Contudo, a *Brugia malayi*, às vezes, é vista sem bainha [449]. A *Brugia timori*, confinada à ilha Sonda Menor, na Indonésia, é semelhante à *Brugia malayi*, porém mais comprida, com menor número de ondulações corporais, espaço cefálico mais comprido, núcleos menos densos e coloração menos intensa [449]. A *Onchocerca volvulus* é vista ocasionalmente no sangue, em especial nas infecções maciças e após tratamento [449]; não tem bainha e tem uma cauda pontuda, sem núcleos.

A síndrome conhecida como eosinofilia tropical, na qual sintomas respiratórios estão associados a eosinofilia e a aumento da formação de *rouleaux* e da VSG, é causada por microfilárias que se movimentam através dos tecidos. Microfilárias, entretanto, não são em geral detectadas no sangue de pacientes com eosinofilia tropical.

Outros testes

São comercializados testes imunológicos rápidos para antígenos de *Wuchereria bancrofti* [449], e testes para *Loa loa* estão sendo desenvolvidos.

Outras fontes para aprendizado da morfologia de distensões sanguíneas

Lewis SM, Bain BJ and Swirsky DM (2001) *Bench Aids in the Morphological Diagnosis of Anaemia*. World Health Organization, Geneva. ISBN 92-4-154532-1.

Bain BJ (2005) Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med*, 353, 498-507.

Bain BJ (2014) *Interactive Haematology Imagebank*, 2nd edn, Wiley-Blackwell, Oxford.

Para imagens de malária e outros parasitos, veja www.med.cmu.ac.th/dept/parasite/default.htm (Chiang Mai University, Thailand) e clique em 'Image' ou 'parasite web link' (ambos úteis) ou www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm (Centers of Disease Control and Prevention, USA).

Tropical Health Technology, Doddington, Cambridgeshire, www.tht.ndirect.co.uk (low-cost books and bench aids for developing countries).

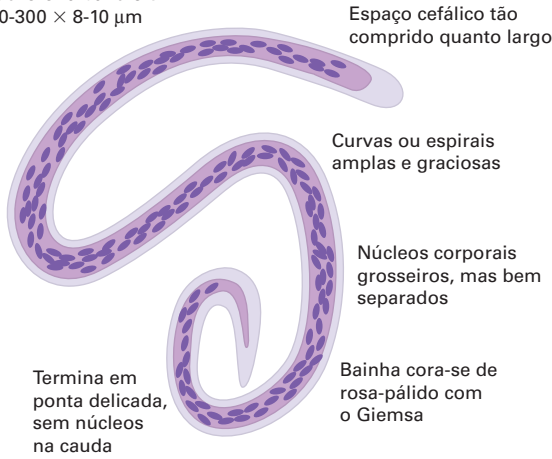
Learning Bench Aid Nº 1. Malaria.

Learning Bench Aid Nº 2. African and S. American Trypanosomiasis-Leishmaniasis.

Learning Bench Aid Nº 3. Microscopical Diagnosis of Lymphatic Filariasis, Loiasis, Onchocerciasis.

* N. de T. Única existente no Brasil.

Wuchereria bancrofti
200-300 × 8-10 µm

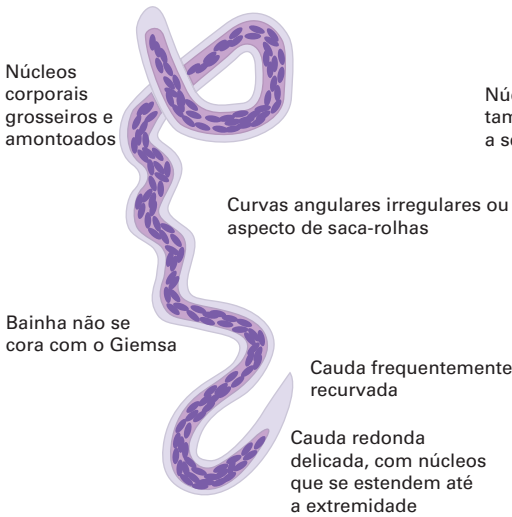


Tamanho do eritrócito para comparação

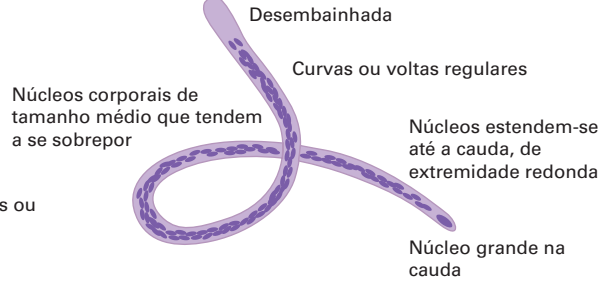
Brugia malayi
220-250 × 6-7 µm



Loa loa
250-300 × 6-8 µm



Mansonella perstans
150-200 × 4 µm



Mansonella ozzardi
MAIS FREQUENTEMENTE DETECTADA NO SANGUE CAPILAR
150-200 × 4 µm

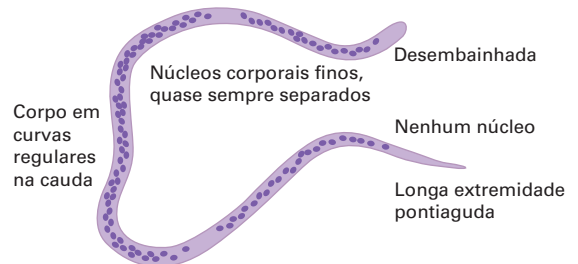


FIGURA 3.198 Características morfológicas que ajudam a distinguir as microfilárias de diferentes espécies de filárias.

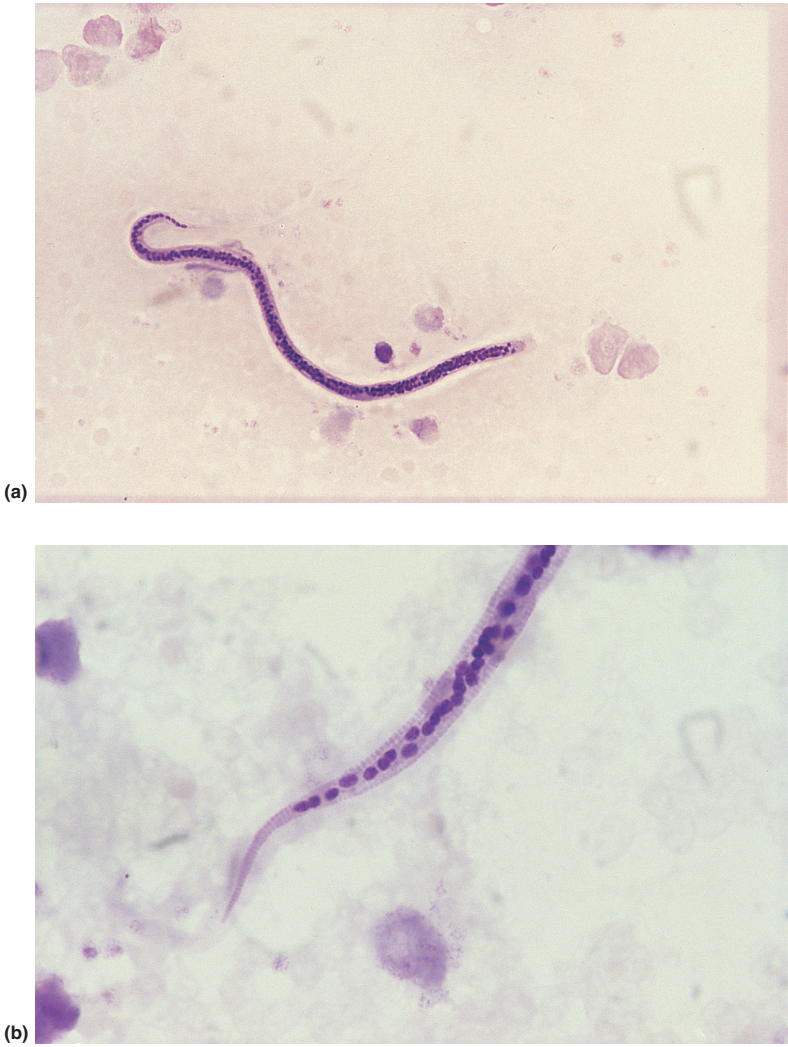
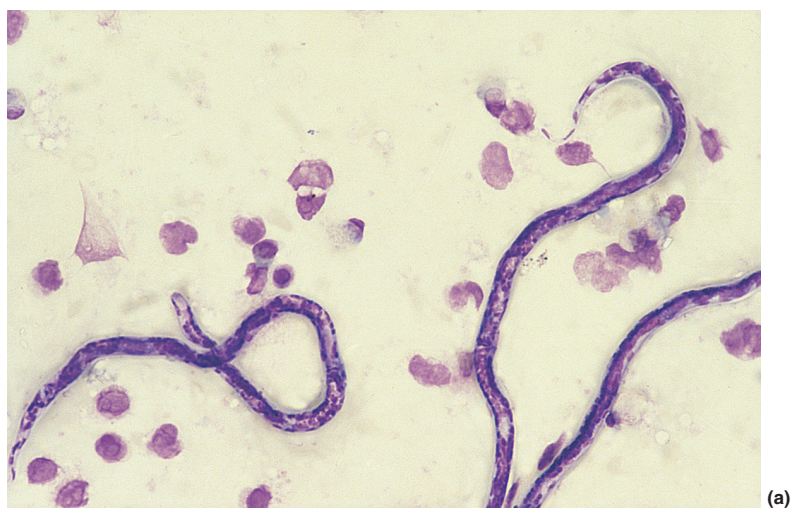


FIGURA 3.199 Microfilárias da *Wuchereria bancrofti* em gota espessa: (a) microfilária mostrando a impressão negativa da bainha (objetiva 40 ×); (b) cauda de microfilária mostrando que os núcleos não se estendem para o interior da cauda.



FIGURA 3.200 Microfilárias da *Brugia malayi* em gota espessa, mostrando os núcleos da cauda amplamente separados. Cortesia do Dr. Saad Abdalla, Londres.



(a)



(b)

FIGURA 3.201 Microfilárias da *Loa loa*: (a) gota espessa mostrando a cabeça e a cauda das microfilárias – os núcleos estendem-se até a cauda (objetiva 40 ×); (b) cauda de microfilária em uma distensão, mostrando a impressão negativa da bainha – os núcleos estendem-se até a cauda.



FIGURA 3.202 Microfilária da *Mansonella perstans* em uma distensão. Cortesia do Dr. Saad Abdalla.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic

**Referências bibliográficas**

- 1 Le Coz C and Goosens A (1998) Contact dermatitis from an immersion oil for microscopy. *N Engl J Med*, **339**, 406–407.
- 2 Nguyen D and Diamond L (2000) *Diagnostic Hematology: a Pattern Approach*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- 3 Bain BJ and Liesner R (1996) Pseudopyropoikilocytosis: a striking artefact. *J Clin Pathol*, **49**, 772–773.
- 4 Anonymous (2009) Chemical-associated artifacts. *Blood*, **113**, 4487.
- 5 Shirato K, Reid C, Ibbetson JS, Hissaria P and Shireen S (2009) Diagnosis of type I cryoglobulinaemia made through identifying crystals in the blood smear. *Australas J Dermatol*, **50**, 281–284.
- 6 Zaini WSM, Hamour S, Swamy R and Kumar P (2013) Type 1 cryoglobulinaemia with precipitated crystals. *Br J Haematol*, **161**, 301.
- 7 Nosanchuk J, Terzian J and Posso M (1987) Circulating mucopolysaccharide (mucin) in two adults with metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, **111**, 545–548.
- 8 Hoffbrand AV and Pettit JE (1988) *Sandoz Atlas of Clinical Haematology*. Gower, London.
- 9 Mohandas N and Gascard P (2000) What do mouse gene knockouts tell us about the structure and function of the red cell membrane? *Clin Haematol*, **12**, 605–620.
- 10 Sheehan RG and Frenkel EP (1983) Influence of hemoglobin phenotype on the mean erythrocyte volume. *Acta Haematol*, **69**, 260–265.
- 11 Maggio A, Gagliano F and Siciliano S (1984) Hemoglobin phenotype and mean erythrocyte volume in Sicilian people. *Acta Haematol*, **71**, 214.
- 12 Kaplan E, Zuelzer WW and Neel JV (1953) Further studies on haemoglobin C alone and in combination with sickle cell anemia. *Blood*, **8**, 735–746.
- 13 Fairbanks VF, Gilchrist GS, Brimhall B, Jereb JA and Goldston EC (1979) Hemoglobin E trait reexamined: a cause of microcytosis and erythrocytosis. *Blood*, **53**, 109–115.
- 14 Bird AR, Wood K, Leisegang F, Mathew CG, Ellis P, Hartley PS and Karabus CD (1984) Hemoglobin E variants: a clinical, haematological and biosynthetic study of four South African families. *Acta Haematol*, **72**, 135–137.
- 15 Stavem P, Romslo I, Hovig T, Rootwelt K and Emblem R (1985) Ferrochelatase deficiency of the bone marrow in a syndrome of congenital microcytic anaemia with iron overload of the liver and hyperferraemia. *Scand J Haematol*, **34**, 204–206.
- 16 Horina JH and Wolf P (2000) Epoetin for severe anemia in hepatoerythropoietic porphyria. *N Engl J Med*, **342**, 1294–1295.
- 17 Shahidi NT, Nathan DE and Diamond LK (1945) Iron deficiency anemia associated with an error of iron metabolism. *J Clin Invest*, **43**, 510–521.
- 18 Cooley TB (1945) A severe form of hereditary anemia with elliptocytosis: interesting sequence of splenectomy. *Am J Med Sci*, **209**, 561–568.
- 19 Hartman KR and Barker JA (1996) Microcytic anemia with iron malabsorption: an inherited disorder of iron metabolism. *Am J Hematol*, **51**, 269–275.
- 20 Andrews NC (1998) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, **341**, 1986–1995.
- 21 Miyoshi I, Saito T and Iwahara Y (2004) Copper deficiency anaemia. *Br J Haematol*, **125**, 106.
- 22 Yachie A, Niida Y, Toma T, Shimura S, Ohta K, Fujimoto K *et al.* (2000) What did we learn from the first case of human heme oxygenase deficiency? *Acta Haematol*, **103**, Suppl. 1, 82.
- 23 Priwitzerova M, Pospisilova D, Prchal JT, Hlobilkova A, Mihal V, Indrak K *et al.* (2003) The first human mutation of DMT1 (Nramp2) causes severe defect of erythropoiesis that can be rescued in vitro by Fe-SiH. *Blood*, **102**, 156a.
- 24 Iolascon A, d'Apolito M, Servedio V, Cimmino F, Piga A and Camaschella C (2006) Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in *DMT1 (SCL11A2)*. *Blood*, **107**, 349–354.
- 25 Camaschella C, Campanella A, De Falco L, Boschetto L, Merlini R, Silvestri L *et al.* (2007) The human counterpart of zebrafish *shiraz* shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, **110**, 1353–1358.
- 26 Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR *et al.* (2008) Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*, **40**, 569–571.
- 27 Ferguson PJ, Chen S, Tayeh MK, Ochoa L, Leal SM, Pelet A *et al.* (2005) Homozygous mutations in *LPIN2* are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J Med Genet*, **42**, 551–557.
- 28 Tulliez M, Testa U, Rochant H, Henri A, Vainchenker W, Toubol J *et al.* (1982) Reticulocytosis, hypochromia, and microcytosis: an unusual presentation of the preleukemic syndrome. *Blood*, **59**, 293–299.
- 29 Ruocco L, Baldi A, Cecconi N, Marini A, Azzarà A, Ambrogi F and Grassi B (1986) Severe pancytopenia due to copper deficiency. *Acta Haematol*, **76**, 224–226.
- 30 Simon SR, Branda RF, Tindle BF and Burns SL (1988) Copper deficiency and sideroblastic anemia associated with zinc ingestion. *Am J Hematol*, **28**, 181–183.
- 31 Ramadurai J, Shapiro C, Kozloff M and Telfer M (1993) Zinc abuse and sideroblastic anemia. *Am J Hematol*, **42**, 227–228.
- 32 Kumar A and Jazieh AR (2001) Case report of sideroblastic anemia caused by ingestion of coins. *Am J Hematol*, **66**, 126–129.

- 33 Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkötter C, Golden BE, Richmond P, Klein N *et al.* (2003) Hyperzincaemia with hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet*, **360**, 1742–1745.
- 34 How J, Davidson RJL and Bewsher PD (1979) Red cell changes in hyperthyroidism. *Scand J Haematol*, **23**, 323–328.
- 35 Ural AU (1997) Anemia related to ascorbic acid deficiency. *Am J Hematol*, **56**, 69.
- 36 Hillman RS and Finch CA (1985) *Red Cell Manual*, 5th edn. FA Davis, Philadelphia.
- 37 Larrick JW and Hyman ES (1984) Acquired iron deficiency anemia caused by an antibody against the transferrin receptor. *N Engl J Med*, **311**, 214–218.
- 38 Cauchi MN and Smith MB (1981) Quantitative aspects of red cell size variation during pregnancy. *Clin Lab Haematol*, **4**, 149–154.
- 39 Helman N and Rubenstein LS (1975) The effects of age, sex, and smoking on erythrocytes and leukocytes. *Am J Clin Pathol*, **63**, 35–44.
- 40 Sallah S, Hanrahan LR and Phillips DL (1999) Intrathecal methotrexate-induced megaloblastic anemia in patients with acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, **123**, 774–777.
- 41 Au WY, Tsang J, Cheng TS, Chow WS, Woo YC, Ma SK and Tam S (2003) Cough mixture abuse as a novel cause of megaloblastic anaemia and peripheral neuropathy. *Br J Haematol*, **123**, 956–957.
- 42 Billemont B, Izzedine H and Rixe O (2007) Macrocytosis due to treatment with sunitinib. *N Engl J Med*, **357**, 1351–1352.
- 43 Gillessen S, Graf L, Korte W and Cerny T (2007) Macrocytosis and cobalamin deficiency in patients treated with sunitinib. *N Engl J Med*, **356**, 2330–2331.
- 44 Horstman AL, Serk SL and Go RS (2005) Macrocytosis associated with monoclonal gammopathy. *Eur J Haematol*, **75**, 146–149.
- 45 Porter KG, McMaster D, Elmes ME and Love AHG (1977) Anaemia and low serum copper during zinc therapy. *Lancet*, **ii**, 774.
- 46 Heaven R, Duncan M and Vukelja SJ (1994) Arsenic intoxication presenting with macrocytosis and peripheral neuropathy, without anemia. *Acta Haematol*, **92**, 142–143.
- 47 Sechi LA, De Carli S, Catena C, Zingaro L and Bartoli E (1996) Benign familial macrocytosis. *Clin Lab Haematol*, **18**, 41–43.
- 48 Willig T-N, Drapchinskaia N, Dianzani I, Ball S, Niemeyer C, Ramenghi U *et al.* (1999) Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond–Blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood*, **94**, 4294–4306.
- 49 Tuckfield A, Ratnaike S, Hussein S and Metz J (1997) A novel form of hereditary sideroblastic anemia with macrocytosis. *Br J Haematol*, **97**, 279–285.
- 50 Mehler PS and Howe SE (1995) Seros fat atrophy with leukopenia in severe anorexia nervosa. *Am J Hematol*, **49**, 171–172.
- 51 Barton JC, Bertoli LF and Rothenberg BE (2000) Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J Lab Clin Med*, **135**, 96–104.
- 52 Papakonstantinou G, Loeffler H, Haerflach T and Brugger W (2010) Severe idiopathic erythroblastic synartesis: successful treatment with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Eur J Haematol*, **84**, 547–549.
- 53 Sipes SL, Weiner CP, Wenstrom KD, Williamson RA and Grant SS (1991) The association between fetal karyotype and mean corpuscular volume. *Am J Obstet Gynecol*, **165**, 1371–1376.
- 54 Eastham RD and Jancar J (1970) Macrocytosis in Down's syndrome and during long term anticonvulsant therapy. *J Clin Pathol*, **23**, 296–298.
- 55 Pai GS, Grush OC and Shuman C (1982) Hematological abnormalities in triploidy. *Am J Dis Child*, **136**, 367–369.
- 56 Bader-Meunier B, Rieux-Laucat F, Croisille L, Yvart J, Mielot F, Dommergues JP *et al.* (2000) Dyserythropoiesis associated with a fas-deficient condition in childhood. *Br J Haematol*, **108**, 300–304.
- 57 Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M and Kuter DJ (2001) Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood*, **98**, 3241–3248.
- 58 Stewart GW and Turner EJH (2000) The hereditary stomatocytoses and allied disorders of erythrocyte membrane permeability to Na and K. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 707–727.
- 59 Rees MI, Worwood M, Thompson PW, Gilbertson C and May A (1994) Red cell dimorphism in a young man with a constitutional chromosomal translocation t(11;22)(p15;q11.21). *Br J Haematol*, **87**, 386–395.
- 60 Perrotta AL and Finch CA (1972) The polychromatophilic erythrocyte. *Am J Clin Pathol*, **57**, 471–477.
- 61 Escobar MC, Rappaport ES, Tipton P, Balentine P and Riggs MW (2002) Reticulocyte estimate from peripheral blood smear: a simple, fast, and economical method for evaluation of anemia. *Lab Med*, **33**, 703–705.
- 62 Rowles PM and Williams ES (1983) Abnormal red cell morphology in venous blood of men climbing at high altitude. *BMJ*, **286**, 1396.
- 63 Franco M, Collec E, Connes P, van den Akker E, Billette de Villemeur T, Belmatoug N *et al.* (2013) Abnormal properties of red blood cells suggest a role in the pathophysiology of Gaucher disease. *Blood*, **121**, 546–555.
- 64 Bessis M (1973) *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*, trans. Weed RI. Springer-Verlag, Berlin.
- 65 Wolf PL and Koett J (1980) Hemolytic anemia in hepatic disease with decreased erythrocyte adenosine triphosphate. *Am J Clin Pathol*, **73**, 785–788.
- 66 Shilo S, Werner D and Hershko C (1985) Acute hemolytic anemia caused by severe hypophosphatemia in diabetic ketoacidosis. *Acta Haematol*, **73**, 55–57.
- 67 Polizzotto MN, Shortt J, Opat SS and Cole-Sinclair MF (2008) A drop of vitriol: microspherocytosis following sulphuric acid exposure. *Br J Haematol*, **140**, 596.
- 68 McGrath KM, Zalcberg JR, Slonin J and Wiley JS (1982) Intralipid induced haemolysis. *Br J Haematol*, **50**, 376–378.

- 69 Bianchi P, Fermo E, Alfinito F, Vercellati C, Baserga M, Ferraro F *et al.* (2003) Molecular characterization of six unrelated Italian patients affected by pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Br J Haematol*, **122**, 847–851.
- 70 Austin RF and Desforges JF (1969) Hereditary elliptocytosis: an unusual presentation of hemolysis in the newborn associated with transient morphologic abnormalities. *Pediatrics*, **44**, 196–200.
- 71 Melvin JD and Watts RG (2002) Severe hypophosphatemia: a rare cause of intravascular hemolysis. *Am J Hematol*, **69**, 223–224.
- 72 Chan TK, Chan WC and Weed RI (1982) Erythrocyte hemighosts: a hallmark of severe oxidative injury *in vivo*. *Br J Haematol*, **50**, 573–582.
- 73 Bain BJ (1999) Images in haematology: Heinz body haemolytic anaemia in Wilson's disease. *Br J Haematol*, **104**, 647.
- 74 Wickramasinghe SN (1998) Congenital dyserythropoietic anaemias: clinical features, haematological morphology and new biochemical data. *Blood Rev*, **12**, 178–200.
- 75 Nurse GT, Coetzer TL and Palek J (1992) The elliptocytoses, ovalocytoses and related disorders. *Baillière's Clin Haematol*, **5**, 187–207.
- 76 Hur M, Lee KM, Cho HC, Park YI, Kim SH, Chang YM *et al.* (2004) Protein 4.1 deficiency and deletion of chromosome 20q are associated with acquired elliptocytosis in myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol*, **26**, 69–72.
- 77 Patel SS, Mehlotra RK, Kastens W, Mgone CS, Kazura JW and Zimmermann PA (2001) The association of the glycophorin C exon 3 deletion with ovalocytosis and malaria susceptibility in the Wosera, Papua New Guinea. *Blood*, **98**, 3489–3491.
- 78 Khositseth S, Sirikanaerat A, Khoprasert S, Opastirakul S, Kingwatanakul P, Thongnoppakhum W and Yenchitsomasus PT (2008) Hematological abnormalities in patients with distal renal tubular acidosis and hemoglobinopathies. *Am J Hematol*, **83**, 465–471.
- 79 Farolino DL, Rustagi PK, Currie MS, Doebelin TD and Logue GL (1986) Teardrop-shaped cells in autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*, **21**, 415–418.
- 80 Domingo-Claros A, Larriba I, Rozman M, Irriguible D, Vallespi T, Aventin A *et al.* (2002) Acute erythroid neoplastic proliferations. A biological study based on 62 patients. *Haematologica*, **87**, 148–153.
- 81 Miwa S, Fujii H, Tani K, Takahashi K, Takegawa S, Fujinami N *et al.* (1981) Two cases of red cell aldolase deficiency associated with hereditary hemolytic anemia in a Japanese family. *Am J Hematol*, **11**, 425–437.
- 82 Carlyle RF, Nichols G and Rowles PM (1979) Abnormal red cells in blood of men subjected to simulated dives. *Lancet*, **i**, 1114–1116.
- 83 Altomare I, Desman G and Aledort LM (2006) Echinocytosis – an unusual manifestation of hemangioma. *Am J Hematol*, **81**, 532–534.
- 84 Feo CT, Tchernia G, Subtil E and Leblond PF (1978) Observations of echinocytosis in eight patients: a phase contrast and SEM study. *Br J Haematol*, **40**, 519–526.
- 85 Roberts I (2011) Personal communication.
- 86 Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, Maljevic S *et al.* (2008) GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinasias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest*, **118**, 2157–2168.
- 87 Kho AN, Hui S, Kesterson JG and McDonald J (2007) Which observations from the complete blood cell count predict mortality for hospitalized patients? *J Hosp Med*, **2**, 5–12.
- 88 Bain BJ and Bain PG (2013) Choro-acanthocytosis. *Am J Hematol*, **88**, 712.
- 89 Higgins JJ, Patterson MC, Papadopoulos NM, Brady RO, Pentchev PG and Barton NW (1992) Hypopretalipoproteinemia, acanthocytosis, retinitis pigmentosa, and pallidal degeneration (HARP syndrome). *Neurology*, **42**, 194–198.
- 90 Udden MM, Umeda M, Hirano Y and Marcus DM (1987) New abnormalities in the morphology, cell surface receptors, and electrolyte metabolism of In(Lu) erythrocytes. *Blood*, **69**, 52–57.
- 91 Bruce LJ, Kay MM, Lawrence C and Tanner MJ (1993) Band 3HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport carries the mutation Pro-868–Leu in the membrane domain of band 3. *Biochem J*, **293**, 317–320.
- 92 Fawaz NA, Beshlawi IO, Al Zadjali S, Al Ghaithi HK, Elnaggari MA, Elnour I *et al.* (2012) dRTA and hemolytic anemia: first detailed description of *SLC4A1* A858D mutation in homozygous state. *Eur J Haematol*, **88**, 350–355.
- 93 Sinha R, Agarwal I, Bawazir WM and Bruce LJ (2013) Renal tubular acidosis with hereditary spherocytosis. *Indian Pediatr*, **50**, 693–695.
- 94 Lainey E, Ogier H and Fenneteau O (2008) Vacuolation of neutrophils and acanthocytosis in a child with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol*, **140**, 595.
- 95 Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Kaku M, Takezono M, Sugihara T *et al.* (1997) Hereditary xerocytosis is a phenotypically different entity from hereditary high red cell membrane phosphatidyl choline hemolytic anemia. *Blood*, **90**, Suppl. 1, 5a.
- 96 Doll DC, Lest AF, Dayhoff DA, Loy TS, Ringenberg QS and Yarbrow JW (1989) Acanthocytosis associated with myelodysplasia. *J Clin Oncol*, **7**, 1569–1572.
- 97 Freson K, Devriendt K, Matthijs G, Van Hoof A, De Vos R, Thys C *et al.* (2001) Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel *GATA1* mutation. *Blood*, **98**, 85–92.
- 98 Lesesve JF, Perrin J, Georges A and Morali A (2009) Acanthocytosis in Anderson's disease. *Br J Haematol*, **145**, 1.
- 99 Palek J and Jarolim P (1993) Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol*, **30**, 249–283.
- 100 Bassen FA and Kornzweig AL (1950) Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*, **5**, 381–387.

- 101 Estes JW, Morley TJ, Levine IM and Emerson CF (1967) A new hereditary acanthocytosis syndrome. *Am J Med*, **42**, 868–881.
- 102 Sakai T, Mawatari S, Iwashita H, Goto I and Kuroiwa Y (1981) Choreoacanthocytosis. *Arch Neurol*, **38**, 335.
- 103 Chowdhury F, Saward R and Erber W (2005) Neuroacanthocytosis. *Br J Haematol*, **131**, 285.
- 104 Rampoldi L, Dobson-Stone C, Rubio JP, Danek A, Chalmers RM, Wood NW *et al.* (2001) A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet*, **28**, 119–120.
- 105 Walker RH, Rasmussen A, Rudnicki D, Holmes SE, Alonso E, Matsuura T *et al.* (2003) Huntington's disease-like 2 can present as chorea-acanthocytosis. *Neurology*, **61**, 1002–1004.
- 106 Udden MM, Umeda M, Hirano Y and Marcus DM (1987) New abnormalities in the morphology, cell surface receptors and electrolyte balance in In(lu) erythrocytes. *Blood*, **69**, 52–57.
- 107 Amare M, Lawson B and Larsen WE (1972) Active extrusion of Heinz bodies in drug-induced haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **23**, 215–219.
- 108 Harrington AM, Ward PCJ and Kroft SH (2008) Iron deficiency anemia, β -thalassaemia minor, and anemia of chronic disease. *Am J Clin Pathol*, **129**, 466–471.
- 109 Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH *et al.*; International Council for Standardization in Haematology (ICSH) (2012) ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol*, **34**, 107–116.
- 110 Ward PC, Smith CM and White JG (1979) Erythrocytic ecdysis. An unusual morphologic finding in a case of sickle cell anemia with intercurrent cold-agglutinin syndrome. *Am J Clin Pathol*, **72**, 479–485.
- 111 Samson RE, Abdalla DH and Bain BJ (1998) Teaching cases from the Royal Marsden and St Mary's Hospitals. Case 18. Severe anaemia and thrombocytopenia with red cell fragmentation. *Leuk Lymphoma*, **31**, 433–435.
- 112 Crook M, Williams A and Schey S (1998) Target cells and stomatocytes in heterozygous familial hypobetalipoproteinaemia. *Eur J Haematol*, **60**, 68–69.
- 113 McGrath KM, Colcutt MF, Gordon A, Sawers RJ and Faragher BS (1984) Dehydrated hereditary stomatocytosis – a report of two families and a review of the literature. *Pathology*, **16**, 146–150.
- 114 Reinhardt WH, Gössi U, Büttiker P, Ott P, Sigrist H, Schatzmann H-J *et al.* (1989) Haemolytic anaemia in alapha-lipoproteinaemia (Tangier disease): morphological, biochemical, and biophysical properties of the red blood cell. *Br J Haematol*, **72**, 272–277.
- 115 Godin DV, Garnett ME, Hoag G, Wadsworth LD and Frohlich J (1988) Erythrocyte abnormalities in hypopalipoproteinemia syndrome resembling fish eye disease. *Eur J Haematol*, **41**, 176–181.
- 116 Clayton PT, Bowron A, Mills KA, Massoud A, Castells M and Milla PJ (1993) Phytosterolaemia in children with parenteral nutrition-associated cholestatic liver disease. *Gastroenterology*, **105**, 1806–1813.
- 117 Exner M and Schwarzwinger I (2001) Targeting the dust. *Br J Haematol*, **114**, 739.
- 118 Lesesve JF, Garçon L and Lecompte T (2010) Transient red-blood-cell morphological anomalies after acute liver dysfunction. *Eur J Haematol*, **84**, 92–93.
- 119 Miller DR, Rickles FR, Lichtman MA, La Celle PL, Bates J and Weed R (1971) A new variant of hereditary hemolytic anemia with stomatocytosis and erythrocyte cation abnormality. *Blood*, **38**, 184–204.
- 120 Davidson RJ, How J and Lessels S (1977) Acquired stomatocytosis: its prevalence and significance in routine haematology. *Scand J Haematol*, **19**, 47–53.
- 121 Wislöff F and Boman D (1979) Acquired stomatocytosis in alcoholic liver disease. *Scand J Haematol*, **23**, 43–50.
- 122 Mallory DM, Rosenfield RE, Wong KY, Heller C, Rubinstein P, Allen FH *et al.* (1976) Rhmod, a second kindred (Craig). *Vox Sang*, **30**, 430–440.
- 123 Gallagher PG and Lux SE (2003) Disorders of the erythrocyte membrane. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn. Saunders, Philadelphia.
- 124 von Behrens WE (1975) Splenomegaly, macrothrombocytopenia and stomatocytosis in healthy Mediterranean subjects. *Scand J Haematol*, **14**, 258–267.
- 125 Rees DC, Iolascon A, Carella M, O'Marraig AS, Kendra JR, Jowitt SN *et al.* (2005) Stomatocytic haemolysis and macrothrombocytopenia (Mediterranean stomatocytosis/macrophthalmocytopenia) is the haematological presentation of phytosterolaemia. *Br J Haematol*, **130**, 297–309.
- 126 Mowafy N (2005) Hematomorphology. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 182–185.
- 127 Corazza GR, Ginaldi L, Zoli G, Frisoni M, Lalli G, Gasbarrini G and Quaglini D (1990) Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. *Clin Lab Haematol*, **12**, 269–275.
- 128 Valentine WN (1979) Hemolytic anemia and inborn errors of metabolism. *Blood*, **54**, 549–559.
- 129 Paglia DE, Valentine WN, Nakatani M and Rauth BJ (1983) Selective accumulation of cytosol CDP-choline as an isolated erythrocyte defect in chronic hemolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 3081–3085.
- 130 Hapgood G and Roy S (2013) A mysterious case of Dr Cabot. *Br J Haematol*, **162**, 719.
- 131 Merino A, To-Figueras J and Herrero C (2006) Atypical red cell inclusions in congenital erythropoietic porphyria. *Br J Haematol*, **132**, 124.
- 132 Green DW, Hendon B and Mimouni FR (1995) Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics*, **96**, 475–478.
- 133 Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S and Krieg M (2007) Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care*, **11**, R62.
- 134 Eichner ER (1984) Erythroid karyorrhexis in the peripheral blood smear in severe arsenic poisoning: a comparison with lead poisoning. *Am J Clin Pathol*, **81**, 533–537.

- 135 Pettit JE, Scott J and Hussein S (1976) EDTA dependent red cell neutrophil rosetting in autoimmune haemolytic anaemia. *J Clin Pathol*, **29**, 345–346.
- 136 Gregory GP, Opat S, Quach H, Shortt J and Tran H (2011) Failure of eculizumab to correct paroxysmal cold hemoglobinuria. *Ann Hematol*, **90**, 989–990.
- 137 Mathy KA and Koepke JA (1974) The clinical usefulness of segmented vs. stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts. *Am J Clin Pathol*, **61**, 947–958.
- 138 Akenzua GI, Hui YT, Milner R and Zipursky A (1974) Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. *Pediatrics*, **54**, 38–42.
- 139 Christensen RD and Rothstein G (1978) Pitfalls in the interpretation of leukocyte counts of newborn infants. *Am J Clin Pathol*, **72**, 608–611.
- 140 Christensen RD, Rothstein G, Anstall HB and Bybee B (1981) Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature bone marrow neutrophils. *Pediatrics*, **70**, 1–6.
- 141 Alvarado A (1986) A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis. *Ann Emerg Med*, **15**, 557–564.
- 142 Chanarin I (1979) *Megaloblastic Anaemias*, 2nd edn. CV Mosby, St Louis.
- 143 Edwin E (1967) The segmentation of polymorphonuclear neutrophils. *Acta Med Scand*, **182**, 401–410.
- 144 Westerman DA, Evans D and Metz J (1999) Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case-control study. *Br J Haematol*, **107**, 512–515.
- 145 Kerrigan DP, Castillo A, Foucar K, Townsend K and Neidhart J (1989) Peripheral blood morphologic changes after high-dose antineoplastic chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration. *Am J Clin Pathol*, **92**, 280–285.
- 146 Wickramasinghe SN (1999) The wide spectrum and unresolved issues of megaloblastic anemia. *Semin Hematol*, **36**, 3–18.
- 147 Davidson WM (1968) Inherited variations in leukocytes. *Semin Haematol*, **5**, 255–274.
- 148 Hess U, Ganser A, Schnürch H-G, Seipelt G, Ottman OG, Falk S *et al.* (1992) Myelokathexis treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *Br J Haematol*, **80**, 254–256.
- 149 Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, Lofsness KG, Pittelkow MR and Fenyk JR (2000) WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet*, **91**, 368–376.
- 150 Davidson WM and Smith DR (1954) A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *BMJ*, **ii**, 6–7.
- 151 Murthy MSN and von Emmerich H (1958) The occurrence of the sex chromatin in white blood cells of young adults. *Am J Clin Pathol*, **30**, 216–227.
- 152 Davidson WM, Fowler JF and Smith DR (1958) Sexing the neutrophil leucocytes in natural and artificial chimaeras. *Br J Haematol*, **4**, 231–238.
- 153 Mittwoch U (1963) The incidence of drumsticks in patients with three X chromosomes. *Cytogenetics*, **2**, 24–33.
- 154 Pai GS, Grush OC and Shuman C (1982) Hematological abnormalities in triploidy. *Am J Dis Child*, **136**, 367–369.
- 155 Tomonaga M, Matsuura G, Watanabe B, Kamochi Y and Ozono N (1961) Leukocyte drumsticks in chronic granulocytic leukaemia and related disorders. *Blood*, **18**, 581–590.
- 156 Archer RK, Engisch HJC, Gaha T and Ruxton J (1971) The eosinophil leucocyte in the blood and bone marrow of patients with Down's anomaly. *Br J Haematol*, **21**, 271–276.
- 157 Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M *et al.*; International Working Group on Morphology of MDS (IWGM-MDS) (2014) Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, **38**, 447–453.
- 158 Huehns ER, Lutzner M and Hecht F (1964) Nuclear abnormalities of the neutrophils in D1(13–15)-trisomy syndrome. *Lancet*, **i**, 589–590.
- 159 Salama ME, Shah V, Lebel RR and VanDyke DL (2004) Aberrant nuclear projections of neutrophils in Trisomy 13. *Arch Pathol Lab Med*, **128**, 243–244.
- 160 Davey FR, Erber WN, Gatter KC and Mason DY (1988) Abnormal neutrophil morphology in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Hum Pathol*, **19**, 454–459.
- 161 Strauss RG, Bove KE, Jones JF, Mauer AM and Fulginiti VA (1974) An anomaly of neutrophil morphology with impaired function. *N Engl J Med*, **290**, 478–484.
- 162 Vilboux T, Lev A, Malicdan MC, Simon AJ, Järvinen P, Racek T *et al.* (2013) A congenital neutrophil defect syndrome associated with mutations in VPS45. *N Engl J Med*, **369**, 54–65.
- 163 Plum CM, Warburg M and Danielsen J (1978) Defective maturation of granulocytes, retinal cysts and multiple skeletal malformations in a mentally retarded girl. *Acta Haematol*, **59**, 53–63.
- 164 Banerjee R, Halil O, Bain BJ, Cummins D and Banner N (2001) Neutrophil dysplasia caused by mycophenolate mofetil. *Transplantation*, **77**, 1608–1610.
- 165 Girolami A, Fabris F, Caronato A and Randi ML (1980) Increased numbers of pseudodrumsticks in neutrophils and large platelets. A 'new' congenital leukocyte and platelet morphological abnormality. *Acta Haematol*, **64**, 324–330.
- 166 Moore CM and Weinger RS (1980) Pseudo-drumsticks in granulocytes of a male with a Yqh+ polymorphism. *Am J Hematol*, **8**, 411–414.
- 167 Gibson BES (1991) Inherited disorders. In: Hann IM, Gibson BES and Letsky EA, eds. *Fetal and Neonatal Haematology*. Baillière Tindall, London.
- 168 Seman G (1959) Sur une anomalie constitutionnelle héréditaire du noyau des polynucléaires neutrophiles. *Rev Hématol*, **14**, 409–412.
- 169 Langenhuijsen MMAC (1984) Neutrophils with ring shaped nuclei in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*, **58**, 227–230.
- 170 Stavem P, Hjort PE, Vogt E and Van der Hagen CB (1969) Ring-shaped nuclei of granulocytes in a

- patient with acute erythroleukaemia. *Scand J Haematol*, **6**, 31–32.
- 171 Kabob T, Saigo K and Yamagishi M (1986) Neutrophils with ring-shaped nuclei in chronic neutrophilic leukaemia. *Am J Clin Pathol*, **86**, 748–751.
 - 172 Craig A (1988) Ring neutrophils in megaloblastic anaemia. *Br J Haematol*, **67**, 247–248.
 - 173 Hernandez JA, Aldred SW, Bruce JR, Vanatta PR, Mattingly TL and Sheehan WW (1980) 'Botryoid' nuclei in neutrophils of patients with heat stroke. *Lancet*, **ii**, 642–643.
 - 174 Neftel KA and Müller OM (1981) Heat-induced radial segmentation of leucocyte nuclei: a non-specific phenomenon accompanying inflammatory and necrotizing diseases. *Br J Haematol*, **48**, 377–382.
 - 175 Gustke SS, Becker GA, Garancis JC, Geimer NF and Pisciotta AV (1970) Chromatin clumping in mature leukocytes: a hitherto unrecognized abnormality. *Blood*, **35**, 637–658.
 - 176 Ozanne C, Bain B and Catovsky D (1996) Teaching cases from the Royal Marsden and St Mary's Hospitals. Case 11: Dysplastic neutrophils in an African woman. *Leuk Lymphoma*, **18**, 351–352.
 - 177 Bain BJ (1989) *Blood Cells: a Practical Guide*. Gower Medical Publishing, London.
 - 178 Brunning RD (1970) Morphologic alterations in nucleated blood and marrow cells in genetic disorders. *Hum Pathol*, **1**, 99–124.
 - 179 Skendzel LP and Hoffman GC (1962) The Pelger anomaly of leukocytes: forty cases in seven families. *Am J Clin Pathol*, **37**, 294–301.
 - 180 Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B *et al.* (2002) Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger–Huët anomaly). *Nat Genet*, **31**, 410–414.
 - 181 Klein A, Hussar AE and Bornstein S (1955) Pelger–Huët anomaly of leukocytes. *N Engl J Med*, **253**, 1057–1062.
 - 182 Erice JG, Pérez JM and Pericás FS (1999) Homozygous form of the Pelger–Huët anomaly. *Haematologica*, **84**, 748.
 - 183 Ardeman S, Chanarin I and Frankland AW (1963) The Pelger–Huët anomaly and megaloblastic anemia. *Blood*, **22**, 472–476.
 - 184 Parmley RT, Tzeng DY, Baehner R and Boxer LA (1983) Abnormal distribution of complex carbohydrates in neutrophils of a patient with lactoferrin deficiency. *Blood*, **62**, 538–548.
 - 185 Deutsch PH and Mandell GL (1985) Reversible Pelger–Huët anomaly associated with ibuprofen therapy. *Arch Intern Med*, **145**, 166.
 - 186 Juneja SK, Matthews JP, Luzinat R, Fan Y, Michael M, Rischin D *et al.* (1996) Association of acquired Pelger–Huët anomaly with taxoid therapy. *Br J Haematol*, **93**, 139–141.
 - 187 May RB and Sunder TR (2005) Hematologic manifestations of long-term valproate therapy. *Epilepsia*, **34**, 1098–1101.
 - 188 Chew E and Juneja S (2013) Botryoid white-cell nuclei. *N Engl J Med*, **368**, e22.
 - 189 Schmitz LL, McClure JS, Letz CE, Dayton V, Weisdorf DJ, Parkin IL and Brunning RD (1994) Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *Am J Clin Pathol*, **101**, 67–75.
 - 190 Dickinson M and Juneja S (2009) Haematological toxicity of colchicine. *Br J Haematol*, **146**, 465.
 - 191 Lach-Szyrma V and Brito-Babapulle F (1997) The significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. *Br J Haematol*, **97**, Suppl. 1, 70.
 - 192 Drouin A, Favier R, Massé J-M, Debili N, Schmitt A, Elbin C *et al.* (2001) Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood*, **98**, 1382–1391.
 - 193 Campbell LJ, Maher DW, Tay DLM, Boyd AW, Rockmart S, McGrath K *et al.* (1992) Marrow proliferation and the appearance of giant neutrophils in response to recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF). *Br J Haematol*, **80**, 298–304.
 - 194 Ryder JW, Lazarus HM and Farhi DC (1992) Bone marrow and blood findings after marrow transplantation and rhGM-CSF therapy. *Am J Clin Pathol*, **97**, 631–637.
 - 195 Ghandi MK, Howard MR and Hamilton PJ (1996) The Alder–Reilly anomaly in association with the myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol*, **18**, 39–40.
 - 196 Gale PF, Parkin JL, Quie PG, Pettitt RE, Nelson RP and Brunning RD (1986) Leukocyte granulation abnormality associated with normal neutrophil function and neurological abnormality. *Am J Clin Pathol*, **86**, 33–49.
 - 197 Newburger PE, Robinson JM, Pryzwansky KB, Rosoff PM, Greenberger JS and Tauber AI (1983) Human neutrophil dysfunction with giant granules and defective activation of the respiratory burst. *Blood*, **61**, 1247–1257.
 - 198 Van Slyck EJ and Rebeck JW (1974) Pseudo-Chediak–Higashi anomaly in acute leukemia. *Am J Clin Pathol*, **62**, 673–678.
 - 199 Merino A and Esteve J (2005) Acute myeloid leukemia with peculiar blast cell inclusions and pseudo-eosinophilia. *Br J Haematol*, **131**, 286.
 - 200 Davidson RJ and McPhie JL (1980) Cytoplasmic vacuolation of peripheral blood cells in acute alcoholism. *J Clin Pathol*, **33**, 1193–1196.
 - 201 Chetty-Raju N, Cook R and Erber W (2005) Vacuolated neutrophils in ethanol toxicity. *Br J Haematol*, **127**, 478.
 - 202 Jordans GHW (1953) The familial occurrence of fat containing vacuoles in the leucocytes diagnosed in two brothers suffering from dystrophic musculorum progressiva. *Acta Med Scand*, **145**, 419–423.
 - 203 Schopfer K and Douglas SD (1976) Fine structural studies of peripheral blood leucocytes from children with kwashiorkor: morphological and functional studies. *Br J Haematol*, **32**, 573–577.
 - 204 Aprikyan AAG, Liles WC, Park JR, Jonas M, Chi EY and Dale DC (2000) Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by

- accelerated apoptosis and defective expression of *bcl-x* in neutrophil precursors. *Blood*, **95**, 320–327.
- 205 Peterson LC, Rao KV, Crosson JT and White JG (1985) Fechtner syndrome – a variant of Alport's syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia. *Blood*, **65**, 397–406.
 - 206 Ribeiro RC, Howard TH, Brandalise S, Behm FG, Parham DM, Wang WC *et al.* (1994) Giant actin inclusions in hematopoietic cells associated with transfusion-dependent anemia and grey skin coloration. *Blood*, **83**, 3717–3726.
 - 207 Yu PH and Wong KF (1996) Circulating leukocytes with ingested mucin in a child with Hirschsprung's disease. *Am J Hematol*, **52**, 240.
 - 208 Chomet B, Kirshen MM, Schaefer G and Mudrik P (1953) The finding of the LE (lupus erythematosus) cells in smears of untreated, freshly drawn peripheral blood. *Blood*, **8**, 1107–1109.
 - 209 Weil SC, Holt S, Hrisinko MA, Little L and De Backer N (1985) Melanin inclusions in peripheral blood leukocytes of a patient with malignant melanoma. *Am J Clin Pathol*, **84**, 679–681.
 - 210 Sen Gupta PC, Ghosal SP, Mukherjee AK and Maity TR (1983) Bilirubin crystals in neutrophils of jaundiced neonates and infants. *Acta Haematol*, **70**, 69–70.
 - 211 Smith H (1967) Unidentified inclusions in haemopoietic cells, congenital atresia of the bile ducts and livedo reticularis in an infant. A new syndrome? *Br J Haematol*, **13**, 695–705.
 - 212 Miale JB (1982) *Laboratory Medicine: Hematology*, 6th edn. CV Mosby, St Louis.
 - 213 Roberts GT, Perry JL, Al-Jefri A and Scott CS (2005) Intraleukocytic hemosiderin inclusions detected as pseudoeosinophils by automated depolarization analysis in a patient with beta-thalassaemia major and immune hemolysis. *Blood Cells Mol Dis*, **34**, 162–165.
 - 214 Hernandez JA and Steane SM (1984) Erythrophagocytosis by segmented neutrophils in paroxysmal cold hemoglobinuria. *Am J Clin Pathol*, **81**, 787–789.
 - 215 Jaber A, Nong M and Thiagarajan P (2006) Transient neutrophilic thrombophagocytosis associated with citrobacter freundii septicemia. *Arch Pathol Lab Med*, **130**, 1754–1755.
 - 216 Campbell V, Fosbury E and Bain BJ (2009) Platelet phagocytosis as a cause of pseudothrombocytopenia. *Am J Hematol*, **84**, 362.
 - 217 Wang J, Fan L, Ma C, Zhang Y and Xu D (2013) Effects of parenteral lipid emulsions on leukocyte numerical and morphological parameters determined by LH750 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, **35**, e4–e7.
 - 218 Schofield KP, Stone PCW, Beddall AC and Stuart J (1983) Quantitative cytochemistry of the toxic granulation blood neutrophil. *Br J Haematol*, **53**, 15–22.
 - 219 Nevšimalová S, Elleder M, Smíd F and Zemánková M (1984) Multiple sulphatase deficiency in homozygotic twins. *J Inherit Metab Dis*, **7**, 38–40.
 - 220 Presentey B (1986) Alder anomaly accompanied by a mutation of the myeloperoxidase structural gene. *Acta Haematol*, **75**, 157–159.
 - 221 Doocey R, Thula R and Jackson S (2002) Giant actin inclusions in hematopoietic cells: a variant of Brandalise syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, **24**, 781–782.
 - 222 Rosenszajn L, Klajman A, Yaffe D and Efrati P (1966) Jordans anomaly in white blood cells. *Blood*, **28**, 258–265.
 - 223 Markesbery WR, McQuillen MP, Procopis PG, Harrison AR and Engel AG (1974) Muscle carnitine deficiency: association with lipid myopathy, vacuolar neuropathy, and vacuolated leukocytes. *Arch Neurol*, **31**, 320–324.
 - 224 Dorfman ML, Hershko C, Eisenberg S and Sagher F (1974) Ichthyosiform dermatosis with systemic lipodosis. *Arch Dermatol*, **110**, 261–266.
 - 225 Chanarin I, Patel A, Slavin G, Wills EJ, Andrews TM and Stewart G (1975) Neutral-lipid storage disease: a new disorder of lipid metabolism. *BMJ*, **i**, 553–555.
 - 226 Cawley JC and Hayhoe FGJ (1972) The inclusions of the May–Hegglin anomaly and Döhle bodies of infection: an ultrastructural comparison. *Br J Haematol*, **22**, 491–496.
 - 227 Abernathy MR (1966) Döhle bodies associated with uncomplicated pregnancy. *Blood*, **27**, 380–385.
 - 228 Itoga T and Laszlo J (1962) Döhle bodies and other granulocytic alterations during chemotherapy with cyclophosphamide. *Blood*, **20**, 668–674.
 - 229 Jenis EH, Takeuchi A, Dillon DE, Ruymann FB and Rivkin S (1971) The May–Hegglin anomaly: ultrastructure of the granulocyte inclusion. *Am J Clin Pathol*, **55**, 187–196.
 - 230 Drachman JG (2004) Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood*, **103**, 390–398.
 - 231 Volpé R and Ogryzlo MA (1955) The cryoglobulin inclusion cell. *Blood*, **10**, 493–496.
 - 232 Dennis R, Cummins D and Amin S (1995) Peripheral blood film deposits in a patient with lymphoproliferative disorder. *Clin Onc*, **7**, 65.
 - 233 Powell HC and Wolf PL (1976) Neutrophilic leukocyte inclusions in colchicine intoxication. *Arch Pathol Lab Med*, **100**, 136–138.
 - 234 Williams ST, Khare VK, Johnston GA and Lackall DP (1995) Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. *Am J Clin Pathol*, **104**, 463–467.
 - 235 Lewandowski K, Homenda W, Mital A, Complak A and Hellmann A (2011) Erythrophagocytosis by neutrophils – a rare morphological phenomenon resulting in acquired haemolytic anaemia? *Int J Lab Hematol*, **33**, 447–450.
 - 236 Au WY and Kwong YL (1999) Haemophagocytosis in the peripheral blood. *Br J Haematol*, **105**, 321.
 - 237 Etzell J, Lu CM, Browne LW and Wang E (2005) Erythrophagocytosis by dysplastic neutrophils in chronic myelomonocytic leukemia and subsequent transformation to acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, **79**, 340–342.
 - 238 Sen Gupta PC, Ghosal SP, Mukherjee AK and Maity TR (1983) Bilirubin crystals in neutrophils of jaundiced neonates and infants. *Acta Haematol*, **70**, 69–70.

- 239 Harris VN, Malysz J and Smith MD (2009) Green neutrophilic inclusions in liver disease. *J Clin Pathol*, **62**, 853–854.
- 240 Davison WM, Milner RDG and Lawler SD (1960) Giant neutrophil leucocytes: an inherited anomaly. *Br J Haematol*, **6**, 339–343.
- 241 Özbek N, Derbent M, Olcay L, Yilmaz Z and Tokel K (2004) Dysplastic changes in the peripheral blood in children with microdeletion 22q11.2. *Am J Hematol*, **77**, 126–131.
- 242 Cooke WE (1927) The macropolycyte. *BMJ*, **i**, 12–13.
- 243 Shidham VB and Swami VK (2000) Evaluation of apoptotic leukocytes in peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med*, **124**, 1291–1294.
- 244 Smith H, Rogers SL, Smith HV, Gillis D, Siskind V and Smith JA (2013) Virus-associated apoptosis of blood neutrophils as a risk factor for invasive meningococcal disease. *J Clin Pathol*, **66**, 976–981.
- 245 Guibaud S, Plumet-Leger A and Frobert Y (1971) Transient neutrophil aggregation in a patient with infectious mononucleosis. *Am J Clin Pathol*, **80**, 883–884.
- 246 Foucar K (2001) *Bone Marrow Pathology*, 2nd edn. ASCP Press, Chicago.
- 247 Nand S, Bansal VK, Kozeny G, Vertuno L, Remlinger KA and Jordan JV (1985) Red cell fragmentation syndrome with the use of subclavian hemodialysis catheters. *Arch Intern Med*, **145**, 1421–1423.
- 248 Tracey R and Smith H (1978) An inherited anomaly of human eosinophils and basophils. *Blood Cells*, **4**, 291–300.
- 249 Presentey BZ (1968) A new anomaly of eosinophilic granulocytes. *Am J Clin Pathol*, **49**, 887–890.
- 250 Archer RK, Engisch HJC, Gaha T and Ruxton J (1971) The eosinophil leucocytes in the blood and bone marrow of patients with Down's anomaly. *Br J Haematol*, **21**, 271–276.
- 251 Kay NE, Nelson DA and Gottleib AJ (1973) Eosinophilic Pelger–Huët anomaly with myeloproliferative disorder. *Am J Clin Pathol*, **60**, 663–668.
- 252 Catovsky D, Bernasconi C, Verdonck PJ, Postma A, Hows J, van der Does-van den Berg A *et al.* (1980) The association of eosinophilia with lymphoblastic leukaemia or lymphoma: a study of seven patients. *Br J Haematol*, **45**, 523–534.
- 253 Bain BJ (1989) The significance of ring eosinophils in humans. *Br J Haematol*, **73**, 580–581.
- 254 Andre E, Chevalier C and Scheiff JM (2011) Howell–Jollylike bodies in leucocytes: first description in leucocytes other than neutrophils. *Eur J Haematol*, **86**, 182–183.
- 255 Chevalier C and Detry G (2012) Vacuolated lymphocytes and abnormal eosinophils in GM gangliosidosis, type 1. *Br J Haematol*, **156**, 293.
- 256 Weil SC and Hrisinko MA (1987) A hybrid eosinophilic–basophilic granulocyte in chronic granulocytic leukaemia. *Am J Clin Pathol*, **87**, 66–70.
- 257 Douglas SD, Blume RS and Wolff SM (1969) Fine structural studies of leukocytes from patients and heterozygotes with the Chediak–Higashi syndrome. *Blood*, **33**, 527–540.
- 258 Groover RV, Burke EC, Gordon H and Berdon WE (1972) The genetic mucopolysaccharidoses. *Semin Haematol*, **9**, 371–402.
- 259 Kolodny EH (1972) Clinical and biochemical genetics of the lipidoses. *Semin Haematol*, **9**, 251–271.
- 260 Forestier F, Hohlfield P, Vial Y, Olin V, Andreux J-P and Tissot J-D (1996) Blood smears and prenatal diagnosis. *Br J Haematol*, **95**, 278–280.
- 261 Patel MS, Callahan JW, Zhang S, Chan AKJ, Unger S, Levin AV *et al.* (1999) Early-infantile galactosialidosis: prenatal presentation and postnatal follow-up. *Am J Med Genet*, **85**, 38–47.
- 262 Maier-Redelsperger M, Stern M-H and Maroteaux P (1988) Pink rings lymphocyte: a new cytologic abnormality characteristic of mucopolysaccharidosis type II Hunter disease. *Pediatrics*, **82**, 286–287.
- 263 van der Meer W, Jakobs BS, Bocca G, Smeitink JAM, Schuurmans Steekhoven JH and de Keijzer MH (2001) Peripheral blood lymphocyte appearance in a case of I cell disease. *J Clin Pathol*, **54**, 724–726.
- 264 Anderson G, Smith VV, Malone M and Sebire NJ (2005) Blood film examination for vacuolated lymphocytes in the diagnosis of metabolic disorders: retrospective experience of more than 2500 cases from a single centre. *J Clin Pathol*, **58**, 1305–1310.
- 265 Iwasaki H, Ueda T, Uchida M, Nakamura T, Takada N and Mahara F (1991) Atypical lymphocytes with a multilobated nucleus from a patient with tsutsugamushi disease (scrub typhus) in Japan. *Am J Hematol*, **36**, 150–151.
- 266 Huhn KM, Dalal BI, Naiman SC and Buskard NA (1995) Case of chronic B-lymphocytic leukemia with clover leaf nuclei. *Am J Hematol*, **49**, 360–361.
- 267 Bachelez H, Hadida F and Gorochoff G (1996) Massive infiltration of the skin by HIV-specific cytotoxic CD8-positive T cells. *N Engl J Med*, **335**, 61–62.
- 268 Wulf GG, Schulz H, Hallermann C, Kunze E and Wörmann B (2001) Reactive polyclonal T-cell lymphocytosis mimicking Sezary syndrome in a patient with hairy cell leukemia. *Haematologica*, **86**, E27.
- 269 Bates I, Bedu-Addo G, Bevan D and Rutherford T (1996) Circulating villous lymphocytes – the link between reactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma. *Br J Haematol*, **93**, Suppl. 1, 69.
- 270 Lesesve J-F, Debouverie M, Decarvalho Bittencourt M and Béné M-C (2011) CD49d blockade by natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis increases immature B-lymphocytes. *Bone Marrow Transplantation*, **46**, 1489–1491.
- 271 Kanegane H, Wado T, Nunogami K, Seki H, Taniguchi N and Tosato G (1996) Chronic persistent Epstein–Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocyte expansion. *Br J Haematol*, **95**, 116–122.
- 272 Prokocimer M and Potasman I (2008) The added value of peripheral blood cell morphology in the diagnosis and management of infectious diseases – part 2: illustrative cases. *Postgrad Med J*, **84**, 586–589.
- 273 Ross DM and Stirling J (2013) Giant parallel tubular arrays in T lymphocytes. *Blood*, **121**, 422.

- 274 Lesesve J-F and Troussard X (2001) EDTA-dependent lymphoagglutination. *Br J Haematol*, **115**, 237.
- 275 Shelton JB and Frank IN (2000) Splenic B cell lymphoma with lymphocyte clusters in peripheral blood smears. *J Clin Pathol*, **53**, 228–230.
- 276 Cobcroft R (1999) Diagnosis of angiotropic large B-cell lymphoma from a peripheral blood film. *Br J Haematol*, **104**, 429.
- 277 Imbing F, Kumar D, Kumar S, Yuoh G and Gardner F (1995) Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes. *J Clin Pathol*, **48**, 584–587.
- 278 Wenburg JJ and Go RS (2003) EDTA-dependent lymphocyte clumping. *Haematologica*, **88**, EIM09.
- 279 Oertel J, Oertel B, Schleicher J and Huhn D (1998) Detection of small numbers of immature cells in the blood of healthy subjects. *J Clin Pathol*, **51**, 886–890.
- 280 Pellat-Deceunynck C, Jego G, Robilard N, Accard F, Amiot M and Bataille R (2000) Reactive plasmacytoses, a model for studying the biology of human plasma cell progenitors and precursors. *Hematol J*, **1**, 362–366.
- 281 Blanchard-Rohner G, Pulickal AS, Jol-van der Zijde CM, Snape MD and Pollard AJ (2009) Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood*, **114**, 4998–5002.
- 282 Shtalrid M, Shvidel L and Vorst E (2003) Polyclonal reactive peripheral blood lymphocytosis mimicking plasma cell leukemia in a patient with staphylococcal sepsis. *Leuk Lymphoma*, **44**, 379–380.
- 283 Gawoski JM and Ooi WW (2003) Dengue fever mimicking plasma cell leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, **127**, 1026–1027.
- 284 Yamane A, Awaya N, Shimizu T, Ikeda Y and Okamoto S (2007) Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with polyclonal proliferation of plasma cells in peripheral blood and marrow. *Acta Haematol*, **117**, 74–77.
- 285 La Raja M (2002) Erythrophagocytosis by peripheral monocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Haematologica*, **87**, EIM14.
- 286 Klein E and Ronez E (2012) Peripheral hemophagocytosis in malaria infection. *Blood*, **119**, 910.
- 287 White JG, Witkop CJ and Gerritsen SM (1973) The Hermansky-Pudlak syndrome: inclusions in circulating leucocytes. *Br J Haematol*, **24**, 761–765.
- 288 Currimbhoy Z (1991) An outbreak of an infection associated with circulating activated monocytes and haemophagocytes in children in Bombay, India. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **13**, 274–279.
- 289 Piankijagum A, Visudhiphan S, Aswapokee P, Suwanagool S, Kruatrachue M and Na-Nakorn S (1977) Hematological changes in typhoid fever. *J Med Assoc Thai*, **60**, 828–838.
- 290 Tsuda H (1997) The use of cyclosporin-A in the treatment of virus-associated haemophagocytic syndrome in adults. *Leuk Lymphoma*, **28**, 73–82.
- 291 Sheehan AM (2011) Peripheral blood and bone marrow manifestations in metabolic storage disease. In: Proytcheva MA (ed.) *Diagnostic Pediatric Hematopathology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- 292 Efrati P and Rozenszajn L (1960) The morphology of buffy coats in normal human adults. *Blood*, **15**, 1012–1019.
- 293 Bennett IM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **51**, 189–199.
- 294 Meteesatien P, Plevy SE, Fender JD and Fedoriw Y (2010) Circulating blasts in a Crohn's patient treated with natalizumab. *Lab Med*, **43**, 453–456.
- 295 Yun HD and Waller EK (2013) Smudge cells following treatment with pentostatin in a patient with B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*, **122**, 474.
- 296 van Hoeven KH, Wanner JL and Ballas SK (1997) Cytologic diagnosis of fat emboli in peripheral blood during sickle cell infarctive crisis. *Diagn Cytopathol*, **17**, 54–56.
- 297 Hicsönmez G and Ozkaynak F (1984) Diagnosis of heterozygous state for Bernard-Soulier disease. *Acta Haematol*, **71**, 285–286.
- 298 Epstein CJ, Sahud MA, Piel CF, Goodman JR, Bernfield MR, Kushner JH and Ablin AR (1972) Hereditary macrothrombocytopathia, nephritis and deafness. *Am J Med*, **52**, 299–310.
- 299 Bellucci S (1997) Megakaryocytes and inherited thrombocytopenias. *Baillière's Clin Haematol*, **10**, 149–162.
- 300 Estes JW (1968) Platelet size and function in the hereditary disorders of connective tissues. *Ann Intern Med*, **68**, 1237–1249.
- 301 Jackson SC, Sinclair GD, Cloutier GD, Duab Z, and ML and Poon MC (2009) The Montreal platelet syndrome kindred has type 2B von Willebrand disease with the VWF V1316M mutation. *Blood*, **113**, 3348–3351.
- 302 Raccuglia G (1971) Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder. *Am J Med*, **51**, 818–827.
- 303 Lesesve J-F, Latger-Cannard V and Lecompte T (2005) Pseudo-storage pool disease due to platelet degranulation in EDTA-collected peripheral blood: a rare artifact. *Clin Lab Haematol*, **27**, 336–342.
- 304 Biddle DA, Neto TG and Nguyen AND (2001) Platelet storage pool deficiency of α and δ granules. *Arch Pathol Lab Med*, **125**, 1125–1126.
- 305 Geddis AE (2005) Congenital cytopenias. The molecular basis of congenital thrombocytopenias: insights into megakaryopoiesis. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 299–305.
- 306 Kim SM, Chang HK, Song JW, Koh H and Han SJ; Severance Pediatric Liver Disease Research Group (2010) Agranular platelets as a cardinal feature of ARC syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, **32**, 253–258.
- 307 Mant MJ, Doery JCG, Gauldie J and Sims H (1975) Pseudothrombocytopenia due to platelet aggregation and degranulation in blood collected in EDTA. *Scand J Haematol*, **15**, 161–170.

- 308 Stavem P and Kjaerheim A (1977) *In vitro* latelet stain preventing (degranulating) effect of various substances. *Scand J Haematol*, **18**, 170–176.
- 309 Cockbill SR, Burmester HB and Heptinstall S (1988) Pseudo grey platelet syndrome – grey platelets due to degranulation of platelets in blood collected into EDTA. *Eur J Haematol*, **41**, 326–333.
- 310 Hamilton RW, Shaikh BS, Ottic JN, Storch AE, Saleem A and White JG (1980) Platelet function, ultrastructure and survival in the May–Hegglin anomaly. *Am J Clin Pathol*, **74**, 663–668.
- 311 Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, Cherif D, Berger R, Debili N *et al.* (1995) A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris–Trousseau) associated with giant platelet α -granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood*, **85**, 1805–1814.
- 312 Fajardo LF and Tallent C (1974) Malaria parasites within human platelets. *JAMA*, **229**, 1205–1207.
- 313 Nurdén P, Debili N, Vainchenker W, Bobe R, Breddoux R, Corvazier E *et al.* (2006) Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood*, **108**, 2587–2595.
- 314 Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro AR and Girolami A (1994) EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIb/IIIa. *J Clin Pathol*, **47**, 625–630.
- 315 Chiurazzi F, Villa MR and Rotoli B (1999) Transplacental transmission of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Haematologica*, **84**, 664.
- 316 Stiegler HM, Fischer Y and Steiner S (1999) Thrombocytopenia and glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonists. *Lancet*, **353**, 1185.
- 317 Español I, Muniz-Díaz E and Domingo-Clarós A (2000) The irreplaceable image: platelet satellitism to granulated lymphocytes. *Haematologica*, **85**, 1322.
- 318 Yoo D, Weems H and Lessin LS (1982) Platelet to leukocyte adherence phenomenon. *Acta Haematol*, **68**, 142–148.
- 319 Campbell V, Fosbury E and Bain BJ (2009) Platelet phagocytosis as a case of pseudothrombocytopenia. *Am J Hematol*, **84**, 362.
- 320 Zandeck M, Genevieve F, Gerard J and Godon A (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol*, **1**, 4–20.
- 321 Lazo-Langner A, Piedras J, Romero-Lagarza P, Lome-Maldonado C, Sanchez-Guerrero J and Lopez-Karpovitch X (2002) Platelet satellitism, spurious neutropenia, and cutaneous vasculitis: casual or causal association? *Am J Hematol*, **70**, 246–249.
- 322 Hosseinzadeh M, Kumar PV and Rahemi M (2006) Platelet satellitism in lupus erythematosus resolving after treatment. *Acta Haematol*, **115**, 131–132.
- 323 Cesca C, Ben-Ezra J and Riley RS (2001) Platelet satellitism as presenting finding in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, **115**, 567–570.
- 324 Latger-Cannard V, Debourgogne A, Montagne K, Plénat F and Lecompte T (2009) Platelet satellitism and lymphoagglutination as presenting finding in marginal zone B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*, **83**, 81–82.
- 325 Hansen M and Pedersen NT (1979) Circulating megakaryocytes in patients with pulmonary inflammation and in patients subjected to cholecystectomy. *Scand J Haematol*, **23**, 211–216.
- 326 Pederson NT and Petersen S (1980) Megakaryocytes in the foetal circulation and in cubital venous blood in the mother before and after delivery. *Scand J Haematol*, **25**, 5–11.
- 327 Pederson NT and Cohn J (1981) Intact megakaryocytes in the venous blood as a marker for thrombopoiesis. *Scand J Haematol*, **27**, 57–63.
- 328 Pederson NT and Laursen B (1983) Megakaryocytes in cubital venous blood in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Scand J Haematol*, **30**, 50–58.
- 329 Swami VK, Solomon-Pestcoe F and Chen X (1996) Significance of circulating megakaryocytes in neonates: a prospective study of 68 cases. *Am J Clin Pathol*, **105**, 513–514.
- 330 Wilde NT, Burgess R, Keenan DJM and Lucas GS (1997) The effect of cardiopulmonary bypass on circulating megakaryocytes. *Br J Haematol*, **98**, 322–327.
- 331 Bianchi DW (1999) Fetal cells in the maternal circulation: feasibility in prenatal diagnosis. *Br J Haematol*, **105**, 574–583.
- 332 Levine RE, Olson TA, Shoff PK, Miller MK and Weisman LE (1996) Mature micromegakaryocytes: an unusual developmental pattern in term infants. *Br J Haematol*, **94**, 391–399.
- 333 Lowenstein ML (1959) The mammalian reticulocyte. *Int Rev Cytol*, **9**, 135–174.
- 334 Xanthou M (1970) Leucocyte blood picture in full-term and premature babies during neonatal period. *Arch Dis Child*, **45**, 242–249.
- 335 Gibson EL, Vaucher Y and Corrigan JJ (1984) Eosinophilia in premature infants: relationship to weight gain. *J Pediatr*, **95**, 99–101.
- 336 Wilkinson LS, Tang A and Gjedsted A (1983) Marked lymphocytosis suggesting chronic lymphocytic leukemia in three patients with hyposplenism. *Am J Med*, **75**, 1053–1056.
- 337 Kelemen E, Gergely P, Lehoczy D, Triska E, Demeter J and Vargha P (1986) Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without concomitant increase of *in vitro* natural killer cell cytotoxicity. *Clin Exp Immunol*, **163**, 696–702.
- 338 Demeter J (1995) Persistent lymphocytosis of natural killer cells after splenectomy. *Br J Haematol*, **91**, 253–254.
- 339 Millard RE and Banerjee DK (1979) Changes in T and B blood lymphocytes after splenectomy. *J Clin Pathol*, **32**, 1045–1049.
- 340 Holyroyde CP and Gardner FH (1970) Acquisition of autophagic vacuoles by human erythrocytes: physiological role of the spleen. *Blood*, **36**, 566–575.

- 341 Kevy SV, Tefft M, Vawter GF and Rosen FS (1968) Hereditary splenic hypoplasia. *Pediatrics*, **42**, 752–757.
- 342 Devriendt K, Naulaers G, Matthijs G, Van Houdt K, Devlieger H, Gewillig M and Fryns JP (1997) Agenesis of corpus callosum and anophthalmia in the asplenia syndrome. A recognisable association? *Ann Genet*, **40**, 14–17.
- 343 Garriga S and Crosby WH (1959) The incidence of leukemia in families of patients with hypoplasia of the marrow. *Blood*, **14**, 1008–1114.
- 344 Leahy RT, Philip RK, Gibbons RJ, Fisher C, Suri M and Reardon W (2005) Asplenia in ATR-X syndrome: a second report. *Am J Med Genet A*, **139**, 37–39.
- 345 Rodin AE, Sloan JA and Nghiem QX (1972) Polysplenia with severe congenital heart disease and Howell-Jolly bodies. *Am J Clin Pathol*, **58**, 127–134.
- 346 Eshel Y, Sarova-Pinhas I, Lampl Y and Jedwab M (1991) Autsplenectomy complicating pneumococcal meningitis in an adult. *Arch Intern Med*, **151**, 998–999.
- 347 Ryan FP, Smart RC, Holdsworth CD and Preston FE (1978) Hyposplenism in inflammatory bowel disease. *Gut*, **19**, 50–55.
- 348 Corazza GR and Gasbarrini G (1983) Defective spleen function and its relation to bowel disease. *Clin Gastroenterol*, **12**, 651–669.
- 349 Dillon AM, Stein HB and English RA (1982) Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*, **96**, 40–43.
- 350 Friedman TC, Thomas PM, Fleisher TA, Feuillan P, Parker RI, Cassorla F and Chrousos GP (1991) Frequent occurrence of asplenia and cholelithiasis in patients with autoimmune polyglandular disease type 1. *Am J Med*, **91**, 625–630.
- 351 Kahls P, Panzer S, Kletter K, Minar E, Stain-Kos M, Walter R *et al.* (1988) Functional asplenia after bone marrow transplantation: a late complication related to extensive chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med*, **109**, 461–464.
- 352 Dailey MO, Coleman CN and Fajardo LF (1981) Splenic injury caused by therapeutic irradiation. *Am J Surg Pathol*, **5**, 325–331.
- 353 Bensinger TA, Keller AR, Merrell LF and O'Leary DS (1971) Thorotrast-induced reticuloendothelial blockade in man. *Am J Med*, **51**, 663–668.
- 354 Kurth D, Deiss A and Cartwright GE (1969) Circulating siderocytes in human subjects. *Blood*, **34**, 754–764.
- 355 Steinberg MH, Gatling RR and Tavassoli M (1983) Evidence of hyposplenism, in the presence of splenomegaly. *Scand J Haematol*, **31**, 437–439.
- 356 Khan AM, Harrington RD, Nadel M and Greenberg BR (1998) Hyposplenism from *Mycobacterium avium* complex infection in a patient with AIDS and immune thrombocytopenia. *Acta Haematol*, **99**, 44–48.
- 357 William BM (2009) Hyposplenism associating long-term asbestos exposure. *Rom J Intern Med*, **47**, 415–416.
- 358 Sunder-Plassmann G, Geissler K and Penner E (1992) Functional asplenia and vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies. *N Engl J Med*, **327**, 437–438.
- 359 Fadel M, Luyt D, Pandya H, Nichani S and Jenkins D (2004) Pneumococcal sepsis: should we look for asplenia? *J R Soc Med*, **97**, 582–583.
- 360 Shanberge IN (1954) Accidental occurrence of endothelial cells in peripheral blood smears. *Am J Clin Pathol*, **25**, 460–464.
- 361 George F, Brouqui P, Bofta M-C, Mutin M, Drancourt M, Brisson C *et al.* (1993) Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced endothelial injury *in vivo* by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood*, **82**, 2109–2116.
- 362 Pooley R, Peterson L, Finn W and Kroft S (1998) Cytomegalovirus-infected cells in routinely prepared peripheral blood films of immunosuppressed patients. *Am J Clin Pathol*, **112**, 108–112.
- 363 Alabdulaali MK, Alayed KM and Baltow BA (2010) Circulating mesothelial cells following multiple ribs fractures. *Br J Haematol*, **149**, 1.
- 364 Christensen WN, Ultmann JE and Mohos SC (1956) Disseminated neuroblastoma in an adult presenting with the picture of thrombocytopenic purpura. *Blood*, **11**, 273–278.
- 365 Nunez C, Abboud SL, Leman NC and Kemp JA (1983) Ovarian rhabdomyosarcoma presenting as leukemia. *Cancer*, **52**, 297–300.
- 366 Pollak ER, Miller HJ and Vye MV (1981) Medulloblastoma presenting as leukemia. *Am J Clin Pathol*, **76**, 98–103.
- 367 Krause JR (1979) Carcinocythemia. *Arch Pathol Lab Med*, **103**, 98.
- 368 Moodley V and Pool R (2003) Circulating neuroblastoma cells in peripheral blood. *Br J Haematol*, **123**, 2.
- 369 Melamed MR, Clifton EE and Seal SH (1962) Cancer cells in the peripheral venous blood. A quantitative study of cells of problematic origin. *Am J Clin Pathol*, **37**, 381–388.
- 370 Brace W, Bain B, Walker M and Catovsky D (1995) Teaching cases from the Royal Marsden Hospital. Case 9: an elderly patient with unusual circulating cells. *Leuk Lymphoma*, **18**, 529–530.
- 371 Trefzer U, Schlegel C, Sterry W, Spath-Schwalbe E, Possinger K and Denkert C (1999) Fulminant intravascular malignant melanoma mimicking acute leukemia. *Blood*, **94**, 1483–1484.
- 372 Swirsky D and Luckit J (1999) Images in haematology: the peripheral blood in metastatic melanoma. *Br J Haematol*, **107**, 219.
- 373 Millar AJ, Sinclair-Smith C, Mills AE, Rode H, Hartley P and Cywes S (1990) Mucin-secreting Wilms' tumor. Report of two cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **12**, 201–204.
- 374 Schaub CR and Farhi DC (1988) Circulating mucin in Wilms' tumor and nephroblastomatosis. Effect

- on leukocyte counts. *Arch Pathol Lab Med*, **112**, 656–657.
- 375 Bouroncle BA (1966) Sternberg–Reed cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin's disease. *Blood*, **27**, 544–556.
- 376 Sinks LF and Clein GP (1966) The cytogenetics and cell metabolism of circulating Reed–Sternberg cells. *Br J Haematol*, **12**, 447–453.
- 377 Le CT (1980) Tick-borne relapsing fever in children. *Pediatrics*, **66**, 963–966.
- 378 Lawrence C, Brown ST and Freundlich LF (1988) Peripheral blood smear bacilemia. *Am J Med*, **85**, 111–113.
- 379 Yu RK, Shepherd LE and Rapson DA (2000) *Capnocytophaga canimorsus*, a potential emerging micro-organism in splenectomized patients. *Br J Haematol*, **109**, 679.
- 380 Gloster ES, Strauss RA, Jimenez JF, Neuberg RW, Berry DH and Turner EJ (1985) Spurious elevated platelet counts associated with bacteremia. *Am J Hematol*, **18**, 329–332.
- 381 Fife A, Hill D, Barton C and Burden P (1993) Gram negative septicaemia diagnosed on peripheral blood smear appearances. *J Clin Pathol*, **47**, 82–84.
- 382 Torlakovic E, Hibbs JR, Miller JS and Litz CE (1996) Intracellular bacteria in blood smears in patients with central venous catheters. *Arch Intern Med*, **155**, 1547–1550.
- 383 Babe KS and Reinhardt JF (1994) Diagnosis of legionella sepsis by examination of a peripheral blood smear. *Clin Inf Dis*, **19**, 1164.
- 384 Fernando SL and Lehmann P (2011) Bugs on film: the presence of bacterial rods (*Citrobacter koseri*) on a routine blood film in a septic immunocompromised patient with a femoral vein line. *Ind J Pathol Bacteriol*, **54**, 840–841.
- 385 Dooley JR (1980) Haemotropic bacteria in man. *Lancet*, **ii**, 1237–1239.
- 386 Rolain J-M, Foucault C, Guieu R, La Scola B, Brouqui P and Raoult D (2002) *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet*, **360**, 226–228.
- 387 Invernizzi R, Travaglini E and Perfetti V (2003) PAS positive monocytes in Whipple's disease. *Haematologica*, **88**, E1M16.
- 388 Puntarić V, Borčić D, Bejuk D, Vrhovec B, Madić J, Busch K and Richter B (1994) Haemotropic bacteria in man. *Lancet*, **343**, 359–360.
- 389 Tarantolo SR, Landmark JD, Iwen PC, Kessinger A, Chan WC and Hinrichs SH (1997) *Bartonella*-like erythrocyte inclusions in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*, **350**, 1602.
- 390 Raoult D, Lepidi H and Harle JR (2001) *Tropheryma whippelii* circulating in blood monocytes. *N Engl J Med*, **345**, 548.
- 391 Godwin JH, Stopeck A, Chang VT and Godwin TA (1991) Mycobacteremia in acquired immune deficiency syndrome. Rapid diagnosis based on inclusions in the peripheral blood smear. *Am J Clin Pathol*, **95**, 369–375.
- 392 Buller RS, Arenó M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y *et al.* (1999) *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med*, **341**, 148–155.
- 393 Chen S-M, Dumler JS, Bakken JS and Walker DH (1994) Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic-agent of human disease. *J Clin Microbiol*, **32**, 589–595.
- 394 Rynkiewicz DL and Liu LX (1994) Human ehrlichiosis in New England. *N Engl J Med*, **330**, 292–293.
- 395 McDade JE (1990) Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. *J Infect Dis*, **161**, 609–617.
- 396 Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AP, Galhardas LC and Bacellar F (1991) First European case of ehrlichiosis. *Lancet*, **338**, 633–634.
- 397 Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK *et al.* (1998) Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*, **339**, 375–378.
- 398 Tamí I, Martínez JI, Tamí M, Redondo MC, Finol H and Simonovis N (1966) Identification of *Ehrlichia* species in blood smear. *Inf Dis Clin Practice*, **5**, 555–557.
- 399 Arraga-Alvarado C, Montero-Ojeda M, Bernardoni A, Anderson BE and Parra O (1996) [Human ehrlichiosis: report of the 1st case in Venezuela] (Article in Spanish). *Invest Clin*, **37**, 35–49.
- 400 Kuberski TT (1977) Intraleukocytic spore formation and leukocytic vacuolization during *Clostridium perfringens* septicemia. *Am J Clin Pathol*, **68**, 794–796.
- 401 Mann JM, Hull HF, Schmid GP and Droke WE (1984) Plague and the peripheral smear. *JAMA*, **251**, 953.
- 402 Monihan JM, Jewell TW and Weir GT (1986) Candida parapsilosis diagnosed by peripheral blood smear. *Arch Pathol Lab Med*, **110**, 1180–1181.
- 403 Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D and Sendid B (2004) Polymicrobial candidaemia revealed by the peripheral blood smear and chromogenic medium. *J Clin Pathol*, **57**, 196–198.
- 404 Girmenia C and Jaalouk G (1994) Detection of Candida in blood smears of patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol*, **52**, 124–125.
- 405 Yao YDC, Arkin CF, Doweiko JP and Hammer SM (1990) Disseminated cryptococcosis diagnosed on peripheral blood smear in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, **89**, 100–102.
- 406 Wong KE, Tsang DNC and Chan JKC (1994) Bone marrow diagnosis of penicilliosis. *N Engl J Med*, **330**, 717–718.
- 407 Nayar R, Marley EF, Laban NLC and Campos JM (1995) Clinical pathology rounds: early diagnosis of fungemia in children. *Lab Med*, **26**, 381–383.
- 408 Bhargava P and Longhi LP (2007) Peripheral smear with *Malassezia furfur*. *N Engl J Med*, **356**, e25.
- 409 Berrouane Y, Bisiau H, Le Baron F, Cattoen C, Duthilleul P and Dei Cas E (1998) *Candida albicans* blastoconidia in peripheral blood smears from non-neutropenic surgical patients. *J Clin Pathol*, **51**, 537–538.
- 410 Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J *et al.* (2004) A large focus

- of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, **363**, 1017–1024.
- 411 Singh B and Daneshvar C (2010) *Plasmodium knowlesi* Malaria in Malaysia. *Med J Malaysia*, **65**, 166–172.
 - 412 Albrecht H, Sobottka I, Stellbrink HJ, van Lunzen J and Greten H (1996) Diagnosis of disseminated toxoplasmosis using a peripheral blood smear. *AIDS*, **10**, 799–800.
 - 413 Willcox ML, Mant J and O'Dempsey T (2013) Imported malaria. *BMJ*, **347**, 34–35.
 - 414 Griffith KS, Lewis LS, Mali S and Parise ME (2007) Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *JAMA*, **297**, 2264–2277.
 - 415 Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S *et al.* (2010) Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*, **201**, 1544–1550.
 - 416 Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matu-sop A, Ratnam S *et al.* (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, **46**, 165–171.
 - 417 Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafàee MZ, Zakaria SK, Divis PC and Singh B (2009) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, **49**, 852–860.
 - 418 Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M *et al.* (2010) *Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo. *Emerg Infect Dis*, **16**, 672–674.
 - 419 Willmann M, Ahmed A, Siner A, Wong IT, Woon LC, Singh B *et al.* (2012) Laboratory markers of disease severity in *Plasmodium knowlesi* infection: a case control study. *Malar J*, **11**, 363.
 - 420 Singh B and Daneshvar C (2013) Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*, **26**, 165–184.
 - 421 Lee KS, Cox-Singh J and Singh B (2009) Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malar J*, **8**, 73.
 - 422 Lee WC, Chin PW, Lau YL, Chin LC, Fong MY, Yap CJ *et al.* (2013) Hyperparasitaemic human *Plasmodium knowlesi* infection with atypical morphology in peninsular Malaysia. *Malar J*, **12**, 88.
 - 423 Wickramasinghe SN and Abdalla SH (2000) Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 277–299.
 - 424 Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K and Newton CRJC (2003) Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol*, **119**, 839–847.
 - 425 Shankar AH and Fawzi WW (2010) Moving toward hematological predictors of disease severity in malaria: going with the flow. *Am J Hematol*, **85**, 225–226.
 - 426 Ladhani S, Khatri P, El-Bashir H and Shingadia D (2005) Imported malaria is a major cause of thrombocytopenia in children presenting to the emergency department in east London. *Br J Haematol*, **129**, 707–709.
 - 427 Chandra S and Chandra H (2013) Role of haematological parameters as an indicator of acute malarial infection in Uttarakhand State of India. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, **5**, e2013009.
 - 428 Lawrence C (1999) Laveran remembered: malaria haemozoin in leucocytes. *Lancet*, **353**, 1852.
 - 429 Day NPJ, Diep PT, Ly PT, Sinh DX, Chuong LV, Chau TTH *et al.* (1996) Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood*, **88**, 4694–4700.
 - 430 Moody AH and Chiodini PL (2000) Methods for the detection of blood parasites. *Clin Lab Haematol*, **22**, 189–202.
 - 431 Bailey JW, Williams J, Bain BJ, Parker-Williams J, Chiodini PL, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. (2013) Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. *Br J Haematol*, **163**, 573–580.
 - 432 Wilson ML (2013) Laboratory diagnosis of malaria: conventional and rapid diagnostic methods. *Arch Pathol Lab Med*, **137**, 805–811.
 - 433 Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E and Chiodini P (2000) Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br J Haematol*, **109**, 891–894.
 - 434 Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T and Warhurst DC (1999) False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet*, **353**, 297.
 - 435 Spach DH, Liles WC, Campbell GL, Quick RE, Anderson DE and Fritsche TR (1993) Tick-borne diseases in the United States. *N Engl J Med*, **329**, 936–947.
 - 436 Yager PH, Luginbuhl LM and Dekker JP (2014) Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 6-2014: a 35-day-old boy with fever, vomiting, mottled skin, and severe anemia. *N Engl J Med*, **370**, 753–762.
 - 437 Vannier E and Krause PJ (2012) Human babesiosis. *N Engl J Med*, **366**, 2397–2407.
 - 438 Beattie JE, Michelson ML and Holman PJ (2002) Acute babesiosis caused by *Babesia divergens* in a resident of Kentucky. *N Engl J Med*, **347**, 697–698.
 - 439 Rajpal DR, Murray DR, Morrell DR and O'Dwyer DR (2005) Human babesiosis: an unusual cause of haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **129**, Suppl. 1, 51.
 - 440 Martinot M, Zadeh MM and De Briel D (2012) Human babesiosis. *N Engl J Med*, **367**, 1070.
 - 441 Setty S, Khalil Z, Schori P, Azar M and Ferrieri P (2003) Babesiosis: two atypical cases from Minnesota and a review. *Am J Clin Pathol*, **120**, 554–559.
 - 442 Pantanowitz L, Ballesteros E and de Girolami P (2001) Laboratory diagnosis of babesiosis. *Lab Med*, **32**, 184–188.
 - 443 Stowell CP, Gelfand JA, Shepard J-AO and Kratz A (2007) Case 17-2007: a 25-year-old woman with

- relapsing fevers and recent onset dyspnea. *N Engl J Med*, **356**, 2313–2319.
- 444 Albrecht H, Sobottka I, Stellbrink H-J, van Lunzen and Greten H (1996) Diagnosis of disseminated toxoplasmosis using a peripheral blood smear. *AIDS*, **10**, 799–800.
- 445 Arnold SJ, Kinney MC, McCormick MS, Dunmer S and Scott MA (1997) Disseminated toxoplasmosis: unusual presentations in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med*, **121**, 869–873.
- 446 <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosomiasisafrican.htm> (accessed April 2014).
- 447 Moore AC, Ryan ET and Waldron MA (2002) A 37-yearold man with fever, hepatosplenomegaly and a cutaneous foot lesion after a trip to Africa. *N Engl J Med*, **346**, 2069–2077.
- 448 Vanhollebeke B, Truc P, Poelvoorde P, Pays A, Joshi PP, Katti R *et al.* (2006) Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. *N Engl J Med*, **355**, 2752–2756.
- 449 Learning Bench Aid No 3 (n.d.) *Microscopical Diagnosis of Lymphatic Filariasis, Loiasis, Onchocerciasis*. Tropical Health Technology, Doddington, Cambridgeshire.

CAPÍTULO 4

Detecção de erros nas contagens de glóbulos

Causas de erros nas contagens de glóbulos

Erros nas contagens de glóbulos podem ser pré-analíticos, analíticos ou pós-analíticos. Dizem-se pré-analíticos os que precedem a etapa de análise da amostra e incluem erros no preenchimento da requisição do exame, erros à punção venosa e erros no transporte e conservação do espécime (Tabela 4.1). Erros pré-analíticos incluem os que resultam da conservação das amostras de sangue à temperatura ambiente. Por exemplo, com o Sysmex 2100, há aumento do volume corpuscular médio (VCM) e do hematócrito (Hct), e uma baixa da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) a partir de 6 horas e, a partir de 48 horas, há aumento da contagem de neutrófilos e diminuição da contagem de monócitos [4]. Os instrumentos Siemens mostram alterações similares nos parâmetros eritroides. É essencial que todos os laboratórios que recebem amostras de sangue de clínicas externas estejam cientes dos efeitos adversos de transporte ou armazenamento prolongados à temperatura ambiente. Erros analíticos são os que ocorrem durante a análise da amostra (Tabela 4.2). Erros pós-analíticos são os que ocorrem após completar-se a análise e incluem o manuseio incorreto dos dados (Tabela 4.3). Às vezes, o erro em uma etapa leva a erro em outra(s). Assim, a identificação incompleta ou errônea de detalhes do paciente ou dos dados clínicos provoca emissão de resultados com limites de referência ou comentários interpretativos enganadores.

Detecção de erros em contagens automatizadas

Como contagens automatizadas de glóbulos podem ser inexatas, é dever da equipe operacional do laboratório e dos técnicos que conferem e liberam os resultados manter permanente atenção para a detecção de possíveis erros.

A liberação do resultado de um hemograma automatizado como válido exige: (i) a certeza de que o instrumento é capaz de determinar com exatidão todos os parâmetros, de que foi calibrado corretamente e de que os procedimentos de controle de qualidade indicam um funcionamento normal; e (ii) a avaliação de cada resultado, julgando se parece estar correto ou se exige revisão. Se tiver sido cumprido o primeiro conjunto de condições, é possível validar os resultados por meio de um programa de computador no *software* do próprio contador automatizado ou desenvolvido para atender às especificações de cada laboratório. Resultados podem ser validados por computador se: (i) todos os parâmetros estiverem dentro de limites predeterminados (que podem ser um pouco mais amplos do que os limites de referência para cada um deles) e não houver *flags* (“alarmes” ou “avisos” da máquina); ou (ii) os resultados saírem dos limites predeterminados, mas não diferirem significativamente de resultados anteriores do mesmo indivíduo (*delta check*). Quando os resultados não se enquadram nos critérios mencionados, devem ser avaliados individualmente quanto aos dados clínicos, e, se necessário, a sequência de providências a seguir deve ser tomada para validá-los: (i) exame dos histogramas para esclarecer os resultados anômalos ou a causa dos *flags*; (ii) exame do espécime de sangue para verificar a data e a hora da coleta, para confirmar se o volume é adequado e se não há coágulos, filamentos de fibrina, hiperlipidemia ou hemólise; (iii) exame microscópico da distensão de sangue; ou (iv) várias combinações desses procedimentos. Quais deles serão necessários dependerá da natureza da anormalidade apresentada pela contagem automatizada e das salvaguardas já instituídas na instrumentação, por exemplo, para confirmar a identidade do paciente e detectar espécimes de volume inadequado ou contendo coágulos. As opiniões divergem no que se refere a sempre examinar a distensão sanguínea quando se faz o primeiro hemograma de um

TABELA 4.1 Algumas causas de erros pré-analíticos nas contagens de glóbulos

Tipo de erro	Exemplos
Erros nos registros	Falta de nome, sexo ou idade do paciente na requisição Falta da origem étnica quando for necessária à interpretação de um resultado Falta de informação sobre gravidez Falta de detalhes clínicos ou da localização do paciente
Transfusão não comunicada	Transfusão prévia desconhecida pelo pessoal do laboratório
Erro na identificação ou na coleta	Coleta de sangue do paciente errado; requisição e amostra de sangue de pacientes diferentes Confusão entre o sangue do recém-nascido e o sangue materno Diluição da amostra (coletada acima de infusão intravenosa; excesso de EDTA líquido em relação ao volume de sangue) Amostra coletada em anticoagulante errado Amostra coletada com concentração excessiva de EDTA Amostra hemoconcentrada devido à manutenção prolongada do torniquete Amostra parcialmente coagulada Amostra hemolisada Amostra inapropriadamente escassa Amostra contaminada com gordura subcutânea [1]
Erro durante coleta de sangue fetal	Contaminação com líquido amniótico [2]
Erro durante transporte ou armazenamento	Amostra inadvertidamente aquecida [3] ou congelada Sangue envelhecido

TABELA 4.2 Algumas causas de erros analíticos nas contagens automatizadas de glóbulos

Tipo de erro	Exemplos
Aspiração incorreta da amostra	Esquecimento de zerar (<i>to prime</i>) o instrumento Homogeneização imperfeita da amostra Bloqueio da sonda de aspiração, por exemplo, por coágulo de amostra anterior Amostra escassa (sonda não a atinge) ou com coágulo não notado Contaminação (<i>carryover</i>) com restos de amostra anterior muito alterada (insignificante com os instrumentos atuais)
Calibração defeituosa	Uso de material de controle como calibrante ou erro na definição de valores do calibrante
Falta de manutenção ou mau funcionamento do instrumento ou reagentes	
Inexatidão inerente a certas metodologias	Subestimação do VCM em contadores de impedância na presença de hipocromia Falta de identificação de células por deficiência de peroxidase
Inexatidão por características incomuns do espécime	Erro na hemoglobina ou nos índices hematimétricos pela presença de crioaglutininas, crioglobulinemia, hiperlipidemia ou (raramente) formação de rosetas de eritrócitos Erro na contagem de plaquetas por agregação ou satelitismo plaquetários Neutropenia espúria ou outra citopenia causada por deficiência de peroxidase

TABELA 4.3 Algumas causas de erros pós-analíticos nas contagens de glóbulos

Tipo de erro
Erros de transcrição no laboratório
Erros de transcrição na internação ou no departamento de pacientes externos na recepção de exames por telefone
Fornecimento de resultados em sequência cronológica incorreta
Resultados que não chegam ao destino apropriado
Resultados arquivados em prontuários de pacientes errados e incorretamente atribuídos a estes
Resultados fornecidos com valores de referência errados ou sem valores de referência
Resultados fornecidos com interpretação errada

paciente, ou aceitar um resultado automatizado, normal e sem *flags*, como evidência válida de que não existem alterações hematológicas significativas. Esta última orientação deixará passar algumas, mas não muitas, anormalidades de significação clínica, e tornou-se atualmente o procedimento usual em todos os laboratórios. A liberação dos resultados exige, também, conferência global para ver se os dados estão completos, isto é, se o programa da máquina não deletou alguns deles em virtude de má replicação nas contagens ou porque se situaram fora dos limites de linearidade do instrumento.

A “probabilidade” dos resultados do hemograma deve ser avaliada à luz dos dados clínicos. Por exemplo, pode-se aceitar, sem maior revisão, uma citopenia em paciente que se sabe ter feito quimioterapia recente. Da mesma forma, pode-se aceitar uma leucocitose com *flag* “desvio à esquerda” no pós-parto ou no pós-operatório. Resultados que apresentem *flags* indicando a presença de blastos, linfócitos atípicos ou eritroblastos (NRBC) sempre exigem revisão microscópica. A necessidade de revisão de *flags* para “desvio à esquerda” ou para “granulócitos imaturos” depende da orientação de cada laboratório. Resultados inesperados de contagens ou resultados muito afastados dos limites de referência exigem especial atenção. Utiliza-se uma CHCM anormal como indicador de resultados errados, pois ela deriva, ao mesmo tempo, de todos os parâmetros eritrocitários medidos: hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (E) e volume corpuscular médio (VCM) ou hematócrito (Hct). Por isso, é sensível a erros na determinação de qualquer um deles, causados, por exemplo, por hiperlipidemia, hemólise, falta de lise dos eritrócitos no canal Hb e aglutinação de eritrócitos. Um VCM excessivamente elevado geralmente é espúrio. Alguns tipos de erros ocorrem

em todos os instrumentos, outros são específicos de uma metodologia. Os laboratoristas devem se familiarizar com os resultados errados próprios ao instrumento que estiverem operando. O restante deste capítulo irá lidar com os resultados espúrios não decorrentes de erros técnicos ou de mau funcionamento dos instrumentos ou reagentes.

Quando a contaminação com líquido amniótico provoca contagens inexatas em amostra de sangue fetal, há dois mecanismos operantes. Um, a simples diluição, que afeta todos os parâmetros. Outro, a ativação da coagulação na amostra, que tem um efeito desproporcionalmente sério na contagem de plaquetas. A microscopia de distensões dessas amostras pode mostrar agregados plaquetários e células amnióticas [2].

Sabe-se que descrições de causas de erro são mais conhecidas e numerosas em aparelhos utilizados há muito tempo ou que foram submetidos a uma avaliação pormenorizada. A falta de menção a resultados errôneos em outros instrumentos não é comprovante de que não ocorram.

Amostras mal-homogeneizadas podem apresentar pseudopoliglobulia, pseudoanemia e erro nas contagens de leucócitos e plaquetas; isso pode ser evitado se houver um procedimento operacional padrão que seja rigorosamente seguido. Há descrição de transfusões de sangue e exames de medula óssea indicados e feitos por essa causa de erro.

Erros na contagem automatizada de leucócitos

Erros que podem ocorrer em contagens automatizadas de leucócitos estão resumidos nas Tabelas 4.4 e 4.5, e na Figura 4.1 [3] são vistos resultados com contagens erradas devido à contaminação da amostra de sangue com gordura subcutânea. As únicas causas frequentes de contagens erradas são as falsas elevações produzidas por eritroblastos, agregados de plaquetas ou falta de lise de eritrócitos. Contagens falsamente baixas são raras, a menos que o sangue tenha levado alguns dias para chegar ao laboratório. Quando há uma baixa contagem de leucócitos por agregação de neutrófilos, esta pode ser EDTA-dependente, temperatura-dependente ou dependente de ambas [15]. A agregação é causada por anticorpo e pode ser revertida pela adição de canamicina em concentração final de 30 mg/mL [15]. Agregação de neutrófilos-plaquetas, que pode representar uma forma exagerada de satelitismo plaquetário, também pode baixar a contagem

TABELA 4.4 Algumas causas de contagem de leucócitos erroneamente elevada

Causa	Instrumentos em que pode ocorrer
Presença de eritroblastos	Todos, salvo os modelos <i>top of line</i> que contam os eritroblastos e excluem da contagem de leucócitos
Falta de lise de eritrócitos	
Uremia	Série Bayer H.1*
Amostras fetais e neonatais	Série Bayer H.1,* Cell-Dyn (nos canais ópticos), alguns Sysmex, Coulter STKS
Hemoglobinas anormais (AS, SS, AC, AE, AD, AO-Arab)	Série Bayer H.1,* alguns Sysmex
Doença hepática	Coulter e alguns Sysmex
Crioaglutininas	Coulter
Síndromes mielodisplásicas	Coulter STKS
Anemia megaloblástica	Coulter
Pós-esplenectomia	Coulter
Numerosas plaquetas gigantes ou restos de megacariócitos	Todos
Agregados plaquetários	Coulter, Bayer e Horiba
Fagocitose de plaquetas por neutrófilos	Cell-Dyn 3500 (contagem óptica inexata; impedância exata) [5]
Crioglobulinemia e criofibrinogenemia	Coulter, Sysmex e Bayer [6]
Precipitação de mucina (em adenocarcinoma e tumor de Wilms)	Ortho ELT-8 [7]
Paraproteinemia	Coulter e Sysmex
Filamentos de fibrina	Coulter
Hiperlipidemia	Coulter
Lipídios exógenos após quimioembolização com Lipiodol	Sysmex XE-2100 [8]
Contaminação da amostra com gordura subcutânea	Série Bayer H.1 [1]
Parasitos da malária	Coulter e Sysmex
<i>Candida glabrata</i>	Canal de basófilos do Siemens Advia 120 e canal Diff do Sysmex XE-2000i [9]
<i>Candida glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i> (principalmente identificados erroneamente como linfócitos)	Série Siemens Advia [10]
<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. dubliniensis</i>	Sysmex XE-2100 (classificados como basófilos), série Siemens Advia (classificados como linfócitos e LUC), e Coulter LH 750 (classificados como eosinófilos) [11]
<i>Candida glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i>	Sysmex XE-2100, mas não série Siemens Advia ou Coulter LH 750 [11]
Microrganismos (se aglutinados)	[12]
Hemoglobina instável	Coulter

LUC, célula grande não corada.

*O canal de basófilos fornece contagem de leucócitos certa, mas a fórmula diferencial é errada.

TABELA 4.5 Algumas causas de contagem de leucócitos erroneamente baixa

Causa	Instrumentos em que pode ocorrer
Lise celular em sangue de mais de 3 dias	Coulter, Cobas Argos 5 Diff, provavelmente outros
Conservação > 24 horas à temperatura ambiente	Cell-Dyn 3500 (diminui no canal óptico, estável no de impedância) [13]
Conservação > 24 horas a 4°C	Horiba
Agregação de leucócitos ou plaquetas devido a um anticorpo, ou a alteração da membrana, ou à presença de células neoplásicas com características anormais (p. ex., agregação de neutrófilos mediada por anticorpo, agregação mediada por mucina em adenocarcinoma, agregação de células linfomatosas ou plasmócitos neoplásicos) – dependendo da causa, pode ser agregação de neutrófilos ou de todos os leucócitos; leucócitos formando rosetas ao redor de outras células [14]	Coulter, Sysmex, série Bayer H.1
Crioaglutinina potente	Coulter

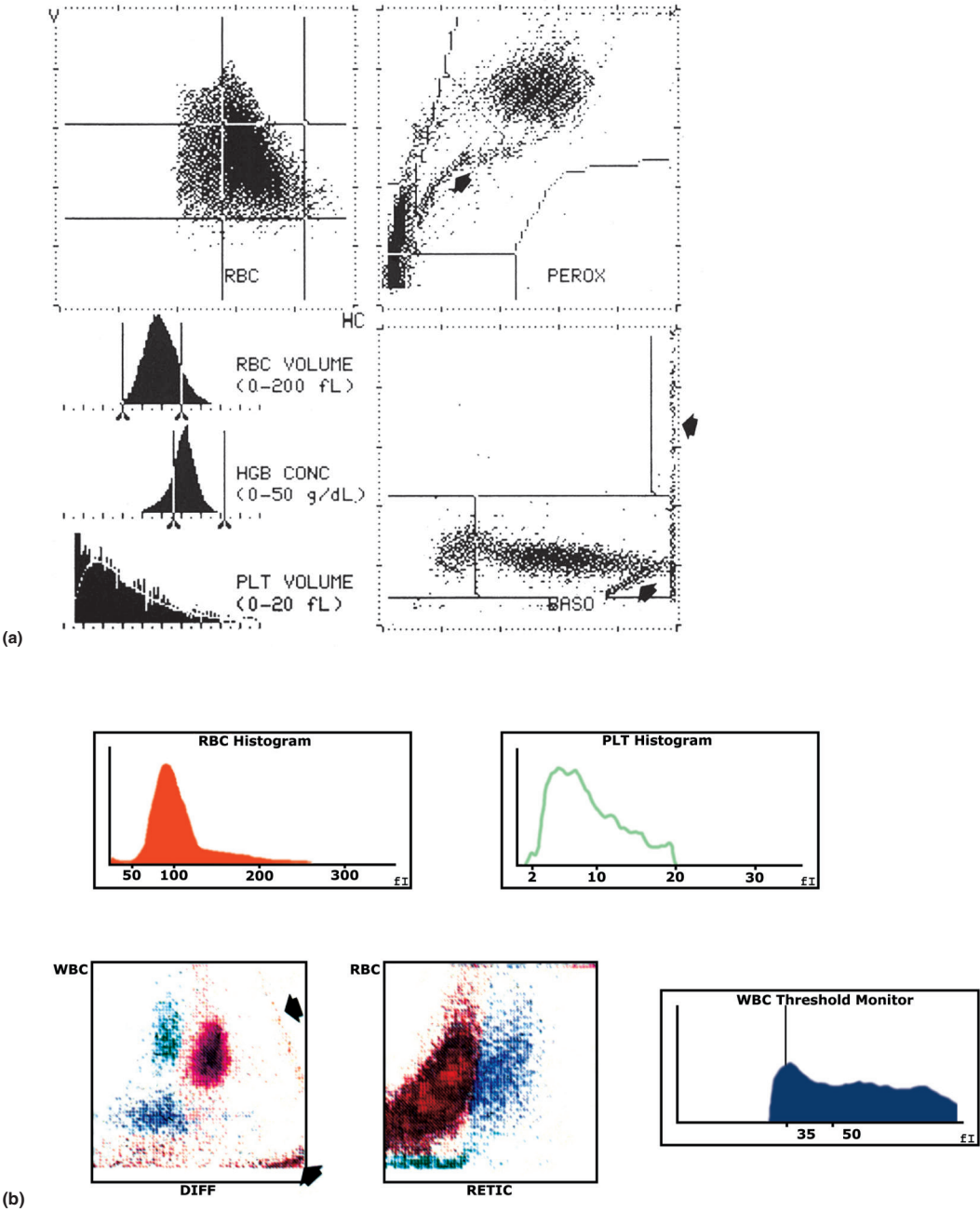


FIGURA 4.1 Resultado dos contadores (a) Bayer H.2 e (b) Beckman-Coulter Gen S de uma amostra acidentalmente contaminada com gordura subcutânea [1]. As setas indicam os sinais gerados pela gordura. As contagens do H.2 foram inexatas; as do Gen S, exatas.

de leucócitos. Um raro fenômeno que pode baixar a contagem de leucócitos é a agregação de células linfomatosas ou de leucemia linfocítica crônica (LLC) e a agregação de todos os tipos de leucócitos [12].

Contagens de leucócitos erradas geralmente são detectadas por *flags* do instrumento, pela improbabilidade dos resultados da contagem ou de outras determinações, ou por alterações notadas nos *scatter plots* ou nos histogramas. Por exemplo, uma contagem errada de leucócitos devido a uma crioaglutinina em geral será acompanhada por incoerências no eritrograma (VCM e CHCM exageradamente altos). A agregação dos neutrófilos pode ser indicada por uma nuvem anormal na parte superior da área de neutrófilos dos instrumentos Coulter STKS ou da série Bayer H.1.

Nos instrumentos mais antigos, se houver um número significativo de eritroblastos, para se ter uma contagem de leucócitos exata, é necessário descontá-los da contagem obtida, que é a do número total de células nucleadas, determinando a porcentagem correspondente a 100 leucócitos em uma fórmula ao microscópio. Também é correto aceitar a contagem total de células nucleadas fornecida pelo instrumento e fazer ao microscópio uma fórmula que inclua os eritroblastos na porcentagem, calculando então os valores absolutos para cada tipo celular. Instrumentos recentes geralmente identificam eritroblastos e corrigem a contagem de leucócitos apropriadamente. Falta de lise de eritrócitos resistentes costuma ser um problema somente na tecnologia de dispersão de luz; em geral não afeta contagens por impedância. A observação de contagens falseadas por falta de lise pode ser clinicamente útil por indicar uma hemoglobinopatia imprevista. Isso é observado nos instrumentos da série H.1 e no canal de fórmula leucocitária dos

instrumentos Sysmex. Agentes químicos administrados a pacientes por via intravenosa podem causar falta de lise dos eritrócitos *in vitro*; um caso, decorrente da presença de óleo de rícino polioxiethylado usado como solvente de paclitaxel, foi notado com um contador CELL-DYN Sapphire [16].

Contagens espúrias decorrentes da agregação plaquetária EDTA-dependente podem ser geralmente contornadas coletando-se o sangue em citrato (deve ser feita correção pela diluição), pela coleta de sangue capilar em oxalato de amônio (previamente Unopette, Becton-Dickinson, agora Thrombo-TIC, Bioanalytic GmbH) ou pela adição de aminoglicosídeo para desagregar grumos plaquetários [17]. Erros causados por crioproteínas e crioaglutininas são evitados pela conservação do sangue aquecido. A agregação de leucócitos é muitas vezes tempo-dependente [18] e causada por um anticorpo a frio, de modo que, conservando-se o sangue aquecido e fazendo-se a contagem logo após a coleta, obtêm-se resultados exatos. Quando as causas de erro não se devem à agregação leucocitária, pode ser necessária a contagem em hemocitômetro.

Contagem de leucócitos muito baixa, causada por erro não notado, já causou a indicação de exame da medula óssea e tratamento com antibiótico e fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) [19].

Erros na dosagem de hemoglobina e nos índices hematimétricos

Dosagem de hemoglobina

Erros que podem ocorrer na dosagem automatizada da Hb e nos índices eritrocitários são apresentados

TABELA 4.6 Algumas causas de dosagem de hemoglobina erroneamente elevada

Causa	Instrumentos em que pode ocorrer	Deteção
Amostra mal-homogeneizada	Todos	Resultado inesperado
Grande leucocitose	Todos, mas em proporção diversa	Conferir sempre que houver grande leucocitose
Hiperlipidemia endógena ou por nutrição parenteral	Coulter e Bayer, Cell-Dyn (mas erro eliminado por modificação do reagente) [20]	Resultados improváveis para HCM e CHCM ou “alarme” de discrepância entre CHCM e MCCH; eritrócitos com contorno impreciso na distensão de sangue
Paraproteína ou hipergamaglobulinemia	Coulter, Sysmex NE-8000, Bayer	HCM e CHCM um pouco aumentadas [21], discrepância entre CHCM e MCCH
Crioglobulinemia	Coulter	HCM e CHCM um pouco aumentadas
Alta concentração de carboxiemoglobina [14]		
Turvação resultante de falta de lise de eritrócitos [14]		

CHCM, concentração hemoglobínica corpuscular média; HCM, hemoglobina corpuscular média; MMCH, média das concentrações corpusculares de hemoglobina.

TABELA 4.7 Algumas causas de erro na contagem de eritrócitos, no VCM e no hematócrito

Erro	Causa	Instrumentos em que pode ocorrer
Contagem de eritrócitos falsamente elevada	Alta contagem de leucócitos	Coulter e Bayer
	Numerosas plaquetas gigantes	Coulter
	Hiperlipidemia (inconstantemente)	Coulter, Bayer (somente taxa muito alta)
	Crioglobulinemia e criofibrinogenemia	Coulter
Contagem de eritrócitos falsamente baixa	Crioaglutininas	Coulter e Bayer
	Anticorpos quentes (raramente)	Coulter S Plus II [22]
	Pan-aglutinação EDTA-dependente	Coulter
	Hemólise <i>in vitro</i> por manipulação inapropriada de amostras ou presença de eritrócitos muito anormais	Todos
	Microcitose extrema ou fragmentação ocasionando presença de eritrócitos abaixo do limiar inferior	Coulter, provavelmente outros
VCM falsamente elevado	Consevação do sangue à temperatura ambiente	A maioria dos instrumentos, em grau variável, mas especialmente Bayer (ver o texto)
	Crioaglutininas e pan-aglutinação EDTA-dependente dos eritrócitos [23]	Coulter e Bayer
	Anticorpos quentes (raramente)	Coulter S Plus II [22]
	Leucocitose muito alta	Coulter
	Estados hiperosmolares (p. ex., hipernatremia, hiperglicemia ou sangue coletado de área próxima à infusão de glicose)	Coulter, Bayer [12]
	Excesso de K ₂ EDTA	Série Bayer H.1
VCM falsamente baixo	Eritrócitos hipocrômicos	Alguns instrumentos de impedância (Coulter STKR e outros Coulter antigos, menos o K-1000, mas não o Sysmex NE-8000) [24]
	Alta temperatura ambiente	Coulter
	Estados hiposmolares (p. ex., hiponatremia)	Coulter
	Excessiva oxigenação da amostra por agitação repetida	Sysmex [25] e provavelmente outros de impedância
Hematócrito falsamente elevado	Elevação errônea do VCM, salvo quando devido a crioaglutinina	Ver acima
	Diminuição errônea da contagem de eritrócitos	Ver acima
Hematócrito falsamente diminuído	Diminuição errônea do VCM	Ver acima
	Diminuição errônea da contagem de eritrócitos por microcitose extrema ou hemólise <i>in vitro</i>	Ver acima
	Crioaglutininas	Coulter
	Excessiva oxigenação da amostra por agitação repetida	Sysmex [25] e provavelmente outros de impedância

nas Tabelas 4.6 a 4.8. São, em geral, notados porque provocam um aumento acentuado do VCM, uma CHCM muito anormal, impossível até, ou, em contadores Siemens Advia, por discrepância entre a CHCM e a média das concentrações corpusculares de hemoglobina (MCCH).

Erros na dosagem de Hb (ver Tabela 4.6) geralmente são devidos à turvação produzida por grande leucocitose ou por lipídios no plasma, sejam endógenos [27, 28] ou decorrentes de nutrição parenteral [29]. O nível da contagem de leucócitos que pode produzir erro na Hb varia muito entre os instrumentos, pois depende da potência do agente

lítico empregado no canal leucócitos/Hb. O problema pode ser contornado usando-se canais separados para a contagem de leucócitos e para a Hb, como nos últimos instrumentos Sysmex, pois se pode utilizar um agente lítico mais forte no canal Hb. O operador tem de conhecer o nível de leucocitose capaz de alterar os resultados da Hb no instrumento em uso, devendo, quando acima, conferir a dosagem com técnicas manuais. O hemolisado é centrifugado antes da leitura da absorvância, para remover os restos celulares de modo a não interferirem na leitura. Suspeita-se de resultado errado devido à hiperlipidemia diante de resultados

TABELA 4.8 Algumas causas de erro na HCM e na CHCM

Erro	Causa	Instrumentos em que pode ocorrer
HCM falsamente elevada	Elevação errônea da hemoglobina	Ver Tabela 4.6
	Diminuição errônea da contagem de eritrócitos	Ver Tabela 4.7
	Hemólise intravascular com hemoglobina livre no plasma (p. ex., na sepse por <i>Clostridium perfringens</i>)	Todos
	Administração de substitutos de sangue baseados em hemoglobina [26]	Todos
	Pan-aglutinina eritrocítica [23]	Coulter
CHCM falsamente elevada ou diminuição real da CHCM disfarçada	Aumento errôneo da hemoglobina	Ver Tabela 4.6
	Hemólise intravascular com hemoglobina livre no plasma ou hemólise <i>in vitro</i>	Todos
	Diminuição errônea do hematócrito ou do produto VCM × contagem de eritrócitos	Ver Tabela 4.7
	Estados hiposmolares	Coulter
	Administração de substitutos de sangue baseados em hemoglobina [26]	Todos
CHCM falsamente diminuída	Pan-aglutinina eritrocítica [23]	Coulter
	Aumento errôneo do VCM (salvo quando causado por crioaglutininas)	Ver Tabela 4.7
	Aumento errôneo da contagem de eritrócitos por numerosas plaquetas gigantes	Todos
	Estados hiperosmolares	Coulter
	Diminuição errônea da hemoglobina causada por leucocitose extrema	Série Bayer H.1 [6]

improváveis dos índices hematimétricos ou quando os eritrócitos, nas distensões, mostrarem contorno impreciso. Confirma-se a hiperlipidemia observando-se o aspecto opalescente do plasma após centrifugação ou sedimentação dos eritrócitos. O problema pode ser resolvido fazendo-se um micro-hematócrito e uma dosagem “branco” de “Hb” com o plasma do paciente (“Hb” do plasma opalescente); a correção obedecerá à seguinte fórmula:

$$\text{Hb verdadeira} = \text{Hb medida} - [\text{“Hb” do plasma opalescente} \times (1 - \text{Hct em fração decimal})]$$

Também se pode remover com cuidado o plasma, substituindo-o por um volume igual de fluido isotônico antes de repetir-se a dosagem automatizada. Da mesma forma, o uso do plasma autólogo como branco permite a correção de erros causados pela presença de uma paraproteína ou de hiper-gamaglobulinemia policlonal (Tabela 4.9). Com os instrumentos Bayer H.1 e Advia 120, quando houver, no plasma, lipídios ou outras substâncias que interfiram, pode-se calcular uma Hb correta a partir do Hct e da MCCH (média das concentrações corpusculares de hemoglobina). Os erros na dosagem de Hb por hiperbilirrubinemia, quando muito elevada, e por altos níveis de carboxiemoglobina não

são de tal grandeza que tenham importância prática, podendo ser desprezados.

Uma Hb erroneamente diminuída é muito mais rara do que uma erroneamente aumentada, mas foi referida em um instrumento Bayer, em 3 pacientes com contagens de leucócitos extremamente elevadas ($243, 348$ e $850 \times 10^3/\mu\text{L}$) [17]. Como os erros refletiram-se, em cada caso, em baixa espúria também da CHCM, tornando-a discrepante da MCCH (medida diretamente), foram percebidos com facilidade; eles foram atribuídos a uma instabilidade da cor obtida na reação colorimétrica, no canal de Hb. Foi descrita uma diminuição na dosagem de Hb causada por sulfemoglobinemia. Aumento da

TABELA 4.9 Erros na dosagem de hemoglobina no Coulter Gen S causados por uma paraproteína

	Eritrograma no sangue total	“Eritrograma” do plasma com EDTA	Eritrograma com eritrócitos lavados e ressuspensos
E ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2,68	0,02	2,62
Hb (g/dL)	10,1	1,7	8,2
VCM (fL)	94,3	88,2	95,5
HCM (pg)	37,6	(sem resultado)	31,4
CHCM (g/dL)	39,9	(sem resultado)	32,9

viscosidade sanguínea pela presença de crioaglutinina ou crioglobulina pode causar aspiração incompleta e consequente diminuição espúria de Hb e E [12].

Eritrócitos, volume corpuscular médio e hematócrito

Erros da contagem de eritrócitos (E), do volume corpuscular médio (VCM) e do hematócrito (Hct) estão resumidos na Tabela 4.7. Os instrumentos de impedância e os primeiros instrumentos de dispersão da luz têm um defeito intrínseco que os leva a subestimar o VCM das células hipocrômicas, superestimando a CHCM. Isso também pode ocasionar duas populações aparentes no histograma de volume dos eritrócitos em amostras de sangue que, nos contadores da série Bayer H.1 e Advia 120, mostram uma única população no histograma de volume, mas duas no histograma de hemoglobinizacão dos eritrócitos.

A conservação prolongada do sangue à temperatura ambiente produz erros do VCM e do Hct. Os instrumentos Coulter geralmente fornecem determinações estáveis, a menos que o sangue tenha sido armazenado por vários dias, mas tem sido observada uma elevação de 6 fL após 24 horas com outro contador de impedância, o Sysmex NE-8000 [31]. Com o Abbott Cell-Dyn 2500, constatou-se uma elevação de 2 a 3 fL em 24 horas [13], e com o Cobas Argos Diff 5, de 2 fL em 24 horas [32]. Alterações importantes ocorrem nos instrumentos da série Bayer H.1 e provavelmente também na série Advia: o aumento do VCM começa em 8 horas, e, em 24 horas, o aumento médio é de 4 a 5 ou 7 a 8 fL, dependendo da temperatura de conservação. Uma CHCM baixa, sem hipocromia correspondente à microscopia, sugere que a elevação do VCM seja provocada pela tumefação dos eritrócitos à estocagem; naturalmente, há aumento espúrio do Hct, paralelo ao do VCM.

Quando as amostras de sangue são processadas sem demora, erros de E, VCM e Hct (excluindo-se os intrínsecos à metodologia) são na maioria das vezes causados por crioaglutininas. Em relação a essa causa, contadores de impedância tendem a apresentar erros maiores do que os atuais instrumentos Siemens, que contam e medem por dispersão da luz. A elevação espúria do VCM decorre da passagem simultânea pela abertura de 2 ou 3 eritrócitos acoplados, contados e medidos como se fossem uma única célula. A contagem de eritrócitos é erroneamente baixa por esse motivo e porque, em alguns contadores, os aglutinados maiores ficam acima do limiar de tamanho para eritrócitos e são excluídos da contagem. Também é subestimado o tamanho dos *doublets*

e *triplets*. Por esses motivos, embora o VCM seja superestimado VCM ($Hct \times 10 \div E$ em milhões/ μL), o Hct é subestimado. A subestimativa de E e do Hct provoca uma elevação espúria da HCM e da CHCM. Em geral, as contagens erradas podem ser evitadas pelo aquecimento da amostra antes de ser processada. Quando a crioaglutinina é muito potente, pode ser necessário tanto o aquecimento da amostra de sangue quanto a pré-diluição em diluente aquecido.

Outras causas de erros de E, VCM e Hct são incomuns. Alterações da osmolaridade plasmática levam a artefatos na determinação do VCM pelos contadores de impedância. Se uma célula estiver em ambiente hiperosmolar *in vivo*, devido a hipernatremia ou hiperglicemia severas, o citoplasma também será hiperosmolar. Quando se dilui o sangue no contador automatizado em um meio com uma osmolaridade muito inferior, o movimento mais rápido da água do que o dos eletrólitos, da glicose ou da ureia através da membrana celular levará a uma súbita inchação da célula, que se reflete no VCM. Como o Hct é calculado a partir do VCM, aumentará na mesma proporção, enquanto a CHCM diminuirá de modo correspondente. Esse fenômeno pode ocorrer na desidratação hipernatrêmica [33], na uremia severa [26] e na hiperglicemia do diabetes descompensado [34]. Não apenas pode produzir-se uma macrocitose fictícia, como pode ser mascarada uma microcitose verdadeira. O erro inverso, VCM e Hct falsamente baixos, com elevação da CHCM, é observado em pacientes com hiponatremia [33], como a que ocorre em alcoolistas crônicos e em pacientes com secreção inadequada de hormônio antidiurético. A redução espúria do VCM nos estados hiposmolares pode causar uma microcitose fictícia, assim como mascarar uma macrocitose verdadeira. Nos instrumentos com módulo de pré-diluição,* esse erro pode ser eliminado dando-se tempo para que os solutos se equilibrem através da membrana dos eritrócitos, antes de levá-los ao módulo de contagem. Deve-se pré-diluir também uma amostra-controle, testando-a paralelamente, pois, embora a osmolaridade do diluente recomendado varie de instrumento a instrumento, todos costumam ser um tanto hipertônicos, podendo a pré-diluição alterar o VCM das células normais.

Com os instrumentos da série Bayer H.1, é possível haver macrocitose espúria devido à inchação celular induzida pelo excesso de K_2EDTA em relação ao volume do sangue vertido no tubo na coleta. Surge também um *flag* de hipocromia [35].

*N. de T. Esses instrumentos não são usados mais no Brasil.

Em casos de microcitose severa, alguns eritrócitos podem ser menores do que o limiar inferior do instrumento e ser excluídos da contagem, com superestimação do VCM. No caso dos contadores de impedância, isso é, em geral, mais do que contrabalançado pelo fato de as células serem provavelmente hipocrômicas, e o erro inerente da metodologia faz subestimar o tamanho das células que ficam acima do limiar. Se houver fragmentos de eritrócitos normocrômicos, que caem abaixo do limiar inferior, o VCM será superestimado, não se esperando qualquer efeito compensador. Nenhum desses artefatos tem importância prática.

Inexatidões do Hct são as esperadas, decorrentes de inexatidões da contagem de eritrócitos e do VCM.

HCM, CHCM e RDW

Erros que podem ocorrer na HCM e na CHCM, resumidos na Tabela 4.8, são consequência de erros nas determinações primárias das quais derivam. Os mecanismos já foram explicados anteriormente. O erro inerente às contagens de impedância faz a CHCM ser um parâmetro muito estável, que deixa de refletir as alterações verdadeiras dos eritrócitos. Isso é paradoxalmente útil, pois anormalidades da CHCM são, em geral, espúrias, servindo para alertar o laboratorista sobre a possibilidade de um resultado incorreto. No caso dos instrumentos Bayer/Siemens, é mais frequente uma anormalidade verdadeira da CHCM, mas a redução fictícia, decorrente da tumefação das células com a conservação, também é frequente. Uma discrepância entre a CHCM e a MCCH serve como “alarme”, pois a última é

determinada diretamente, não sendo afetada pelos erros na dosagem de hemoglobina.

Com os instrumentos Coulter e, provavelmente, com outros, o RDW (amplitude de distribuição dos eritrócitos) aumenta com o armazenamento do sangue à temperatura ambiente. No caso do Coulter Gen S, o aumento começa a ser notado a partir de 2 dias [36].

Erros na contagem de plaquetas

As causas de erros nas contagens de plaquetas estão resumidas nas Tabelas 4.10 e 4.11; em muitos instrumentos, a contagem é inexata quando o número de plaquetas é muito baixo. Um pequeno grau de inacurácia pode tornar-se clinicamente relevante quando a contagem de 10.000/ μ L é usada como sinal (“gatilho”) para a indicação de transfusão de plaquetas, como em pacientes em tratamento de leucemia aguda. Em um estudo, um método imunológico (Cell-Dyn) e um óptico (XE-2100) mostraram-se acurados, enquanto um método de impedância (LH 750) e quatro métodos ópticos (H.3, Advia, Cell-Dyn e XE-2100) superestimaram as contagens em $2-5 \times 10^3/\mu$ L [53]. O método de impedância do Pentra 120 subestimou as contagens por cerca de $4 \times 10^3/\mu$ L. Em contadores de impedância (sem especificação da marca), foram descritas contagens de plaquetas subestimadas em comparação com contagens por imunofluorescência em citometria em fluxo, em pacientes com púrpura trombocitopênica autoimune [54], enquanto em pacientes com leucemia e linfoma parece ter havido superestimação. Em comparação

TABELA 4.10 Algumas causas de contagens automatizadas de plaquetas falsamente baixas

Causa	Instrumentos em que foi notada
Coagulação parcial da amostra	Todos
Ativação plaquetária na coleta e consequente agregação	Todos
Ativação de plaquetas durante <i>bypass</i> cardiopulmonar [37]	Todos
Agregação plaquetária induzida por EDTA (parece ser mais comum em infecções virais, particularmente hepatite A, mas também citomegalovirose e influenza A) [38]	Todos
Degranulação e tumefação plaquetárias induzida por EDTA	Coulter STKS [39]
Agregação plaquetária induzida por lipiodol após quimioembolização	Descrita no Sysmex XE-2100, mas provavelmente ocorre com todos [8]
Satelitismo plaquetário	Todos
Conservação do sangue a 4°C > 24 horas	Horiba
Fagocitose de plaquetas por neutrófilos e monócitos	Notada no Cell-Dyn 3500, mas deve ocorrer com todos [5]
Plaquetas gigantes, acima do limiar de contagem	Todos

EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.

TABELA 4.11 Algumas causas de contagens automatizadas de plaquetas falsamente elevadas

Causa	Instrumentos em que foi notada
Microcitose, ou eritrócitos fragmentados, abaixo do limiar superior da contagem de plaquetas	Todos
Microesferócitos em esferocitose hereditária	Coulter MAXM [41]
Microesferócitos em queimaduras	Coulter [42, 43]
Aquecimento inadvertido da amostra de sangue	Série Bayer H.1 [3]
Fragmentos de leucócitos (blastos, <i>hairy cells</i> , células linfomatosas) contados como plaquetas	Todos
Hemoglobinopatia H	Coulter
Crioglobulinemia (contagem e histograma plaquetários corrigidos pelo aquecimento da amostra)	Coulter, série Bayer H.1, Cell-Dyn 4000 (contagem por impedância inacurada, contagem óptica acurada) [44]
Hipertrigliceridemia ou hiperlipidemia	Sysmex NE-8000, série Bayer H.1 [20, 45], contadores de impedância
Uso de emulsões de perfluorocarbono (substituto de sangue)	Cel-Dyn 3200 e 3500 (tanto na contagem óptica como na contagem por impedância) [46]
Bactérias na amostra de sangue, por bacteriemia [47, 48] ou por demora no processamento em clima quente [49]	Ortho ELT8 [47], Cell-Dyn 4000 [48]
Fungos na amostra de sangue, geralmente por crescimento em cateteres venosos profundos	Séries Bayer H.1 [50] e Advia, Sysmex XT-2000i [9]
<i>Candida glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i> (mas não <i>C. albicans</i>)	Série Siemens Advia [10]
Eritrócitos parasitados por <i>Plasmodium</i>	Cell-Dyn 4000, canais óptico e de impedância [51]
Partículas não plaquetárias em concentrados de plaquetas	Sysmex XE-2100 e Advia 120, contagens ópticas, mas não contagens por impedância no Sysmex [52]

feita entre quatro instrumentos, em pacientes de leucemia aguda ou com suspeita de coagulação intravascular disseminada, foi confirmada boa correlação com o método internacional de referência, mas o Cell-Dyn Sapphire, o Sysmex XE-2100 e o Beckman-Coulter LH 750 mostraram tendência a subestimar as contagens; só o Advia 2120 não subestimou [55]. O erro nas contagens pareceu ser mais comum nos casos em que havia evidências de ativação plaquetária, que causa perda de grânulos e esferização das plaquetas [55].

Além desses erros, intrínsecos à tecnologia, erros significativos da contagem de plaquetas podem decorrer de características próprias da amostra de sangue. Contagens erroneamente baixas são muito comuns, como consequência de coagulação parcial do espécime e de agregação e satelitismo plaquetários. A agregação plaquetária pode ser decorrente da ativação durante uma punção venosa difícil ou pode ser mediada por um anticorpo, que tanto pode ser IgG como IgM EDTA-dependente ou EDTA-independente. Os anticorpos IgG são dirigidos a um criptoantígeno na glicoproteína plaquetária IIb [56]. A agregação plaquetária EDTA-dependente pode ser um fenômeno transiente ocorrendo, por exemplo, na mononucleose infecciosa [57]. O fenômeno normalmente gera *flags* no instrumento e causa alterações no histograma de distribuição das plaquetas e nos *scatter plots* de leucócitos. *Scatter plots* leucocitários

anormais podem determinar a presença de *flags* de erro na contagem de plaquetas, não notados no canal plaquetário; isso é mais provável em instrumentos que fazem contagem diferencial automatizada de leucócitos do que em instrumentos sem essa capacidade. Satelitismo plaquetário também é um fenômeno mediado por anticorpo EDTA-dependente; o satelitismo pode ser seguido por fagocitose de plaquetas [58]. Nem a agregação *in vitro* nem o satelitismo plaquetário possuem significância *in vivo*, mas, por causarem contagens de plaquetas falsamente baixas, é muito importante detectá-los, evitando investigações e tratamentos desnecessários. Houve casos em que contagens errôneas de plaquetas levaram ao diagnóstico equivocado de púrpura trombocitopênica “idiopática” (PTI), com consequente tratamento com corticoides e, até mesmo, com esplenectomia. Contagens exatas em pessoas com agregação EDTA-dependente podem ser obtidas adicionando-se 20 mg de canamicina ao EDTA do tubo de coleta ou à amostra de sangue já coletado [59], adicionando-se um excesso de EDTA para causar desagregação ou usando MgSO₄ como anticoagulante [60]. Alternativamente, uma nova amostra pode ser coletada em citrato de sódio, ou pode ser coletada uma gota de sangue por picada no dedo com um anticoagulante alternativo, como o oxalato de amônio.

É preciso confirmar, sem exceção, a exatidão de todas as contagens de plaquetas inesperadamente

baixas. Deve-se examinar a amostra com um bastãozinho de madeira, para detectar pequenos coágulos ou filamentos de fibrina, e acessar os histogramas plaquetários e os *scatter plots* do instrumento. Alguns instrumentos detectam filamentos de fibrina e pequenos coágulos e emitem *flags*. Também pode aparecer *flag* pela presença de agregados de plaquetas, ou estes podem ser aparentes, nos *scatter plots*, como *clusters* ou faixas de partículas anormais. Na série H.1, a presença de um *cluster* anormal perto da parte superior da caixa de neutrófilos pode indicar a ocorrência de satelitismo plaquetário. Contudo, nem todas as contagens de plaquetas falsamente baixas geram *flags* ou estão associadas a *scatter plots* anormais. Por exemplo, os agregados plaquetários podem ser tão grandes a ponto de alcançar o tamanho de leucócitos, não sendo, por isso, identificados. Portanto, sempre que ocorrer uma contagem de plaquetas inesperadamente baixa, é indispensável a microscopia da distensão sanguínea para verificar se não existem filamentos de fibrina, agregados ou satelitismo plaquetários e plaquetas gigantes. Contagens falsamente baixas devem ser retiradas dos resultados, pois o médico requisitante pode não perceber que um comentário, como “agregados plaquetários”, é provável indicativo de incorreção na contagem; transfusões de plaquetas já foram mal indicadas e feitas por esse motivo. Quando a agregação plaquetária é mediada por anticorpos, é possível obter contagens exatas em amostras colhidas em citrato ou heparina em vez de EDTA (mas deve-se considerar o efeito de diluição). Alguns desses anticorpos são anticorpos frios, por isso também se pode obter uma contagem válida fazendo-se a contagem imediatamente em amostra mantida aquecida. Ou, então, se o número de plaquetas for claramente normal, pode-se fazer o comentário “número normal de plaquetas à microscopia da distensão de sangue”, dispensando-se nova coleta de sangue. Quando ocorre agregação em pacientes em tratamento por trombocitemia essencial, há necessidade de proceder aos métodos adequados à obtenção de uma contagem acurada para a monitorização [61]. Os laboratórios e os médicos requisitantes devem estar alertas à agregação causada pelo tratamento com anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos plaquetários, como o abciximabe, pois esses agentes podem causar, também, trombocitopenia real [62, 63]. Se houver muitas plaquetas gigantes, pode ser impossível obter uma contagem automatizada exata, devendo-se fazê-la em hemocítmetro. Alternativamente, a relação plaquetas/eritrócitos pode ser estimada à microscopia e a contagem de

plaquetas, estimada pela contagem de eritrócitos.* Se uma contagem baixa de plaquetas for concordante com a microscopia da respectiva distensão, mas inesperada, mesmo assim deve-se coletar nova amostra, com atenção especial à punção venosa antes de se considerar o resultado válido, pois deste dependerão decisões clínicas e terapêuticas.

Contagens de plaquetas falsamente elevadas são muito menos frequentes do que contagens falsamente baixas. Em geral, são devidas a uma microcitose acentuada (p. ex., na hemoglobinopatia H) ou à fragmentação de eritrócitos (p. ex., na anemia hemolítica microangiopática, em queimaduras graves ou na piropecilocitose hereditária), fazendo um número significativo de eritrócitos ficar abaixo do limiar superior para plaquetas. Elevação espúria da contagem de plaquetas pode ser gerada pela fragmentação eritrocitária produzida pelo aquecimento inadvertido, *in vitro*, da amostra de sangue [3]. Inclusive com limiares variáveis e curvas adaptadas, nem sempre é possível separar das plaquetas os eritrócitos muito pequenos ou seus fragmentos. O Sysmex R-1000 Reticulocyte Analyzer pode fazer contagens exatas de plaquetas até mesmo na presença de fragmentos eritrocitários ou de micrócitos. O RNA das plaquetas e dos reticulócitos é corado com um corante fluorescente, a auramina, separando-se as duas populações por limiar de volume [64]. Os eritrócitos microcíticos não se coram, pois não contêm RNA.

Às vezes, há contagens falsamente elevadas de plaquetas devido à presença de outras partículas com o tamanho de plaquetas. Já foi descrita a contagem de fragmentos de citoplasma de leucócitos como plaquetas em leucemias mieloides agudas [65, 66] (Figura 4.2), em leucemia linfoblástica aguda [66], em leucemia de células pilosas [67] e em linfomas [68]. Em leucemias agudas, esse fenômeno é relativamente comum [66]. A contagem de fragmentos de eritrócitos e de leucócitos como plaquetas [42] ou de partículas estranhas como fungos [50] (Figura 4.3) pode ter graves implicações na leucemia aguda, pois pode deixar uma trombocitopenia severa sem tratamento.

Quando as plaquetas se distribuem uniformemente na distensão sanguínea, é possível validar a contagem avaliando-se a proporção entre plaquetas e eritrócitos e estimando-a a partir da contagem de eritrócitos.

Com os instrumentos Coulter, provavelmente também com outros, o VPM eleva-se com a conservação da amostra de sangue à temperatura

*N. de T. A observação no Cella Vision é particularmente adequada a esse fim.

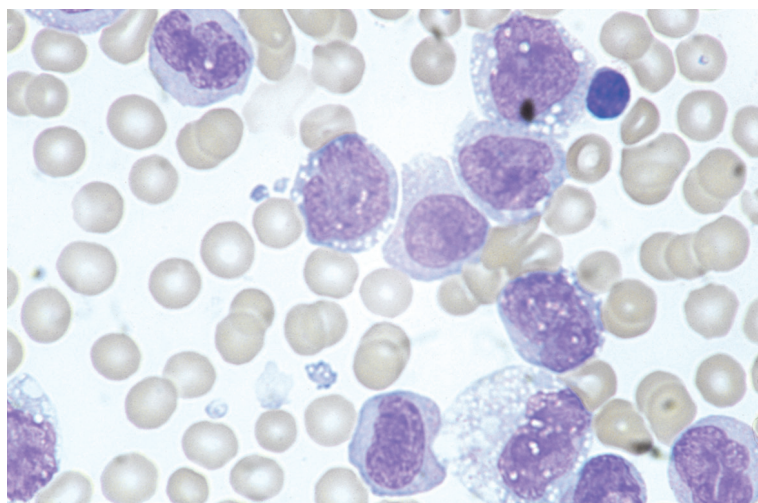


FIGURA 4.2 Sangue periférico de paciente com leucemia monoblastica aguda. Apesar da contagem de “plaquetas” estar apenas moderadamente diminuída, o paciente teve grave sangramento. A inspeção da distensão mostrou a presença de muitos fragmentos de citoplasma das células leucêmicas, de tamanho similar a plaquetas, que causaram contagem errada no Beckman-Coulter Gen S.

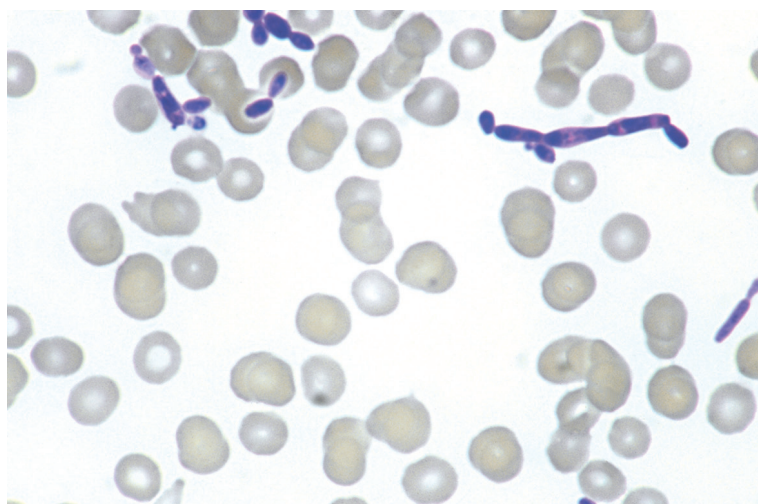


FIGURA 4.3 Sangue periférico de paciente com pancitopenia persistente após quimioterapia intensiva para LMA. Após semanas de dependência de transfusão de plaquetas, a contagem aumentou subitamente. A inspeção da distensão mostrou que as plaquetas continuavam escassas; as partículas contadas eram fungos, identificados como *Candida glabrata*, originários do cateter venoso central [50].

ambiente. No caso do Coulter Gen S, a elevação começa no segundo dia de conservação [36]. Com o Coulter STKS e o Sysmex SE-9000, tem sido observada uma elevação artefactual do VPM como resultado de tumefação e degranulação plaquetária em sangue anticoagulado com EDTA [39].

Erros nas fórmulas leucocitárias automatizadas

As contagens diferenciais automatizadas de leucócitos devem ser consideradas como uma forma de triagem das amostras de sangue quanto a alguma anormalidade, e de produção de uma contagem diferencial (fórmula leucocitária) quando há apenas anormalidades numéricas. Os instrumentos podem

apresentar inexatidões sistemáticas ou apenas com alguns tipos de amostras anormais.

Quando a média das contagens automatizadas das diferentes categorias de leucócitos é comparada com a média de contagens feitas ao microscópio, não é raro os instrumentos automatizados apresentarem inexatidões estatisticamente significativas, mas muito pequenas para terem importância prática. Mesmo havendo discrepâncias maiores, nem sempre se constituem em problema prático, pois os resultados dos pacientes serão avaliados com limites de referência derivados do mesmo instrumento.

É comum haver amostras de sangue com características anormais que impedem contagens automatizadas exatas, por exemplo, quando contêm células para as quais o instrumento não possui critérios de identificação. Há divergências de filosofia

entre os fabricantes dos diversos instrumentos: alguns optam por simplesmente rejeitar os resultados (STKS e Sysmex NE-8000), outros fornecem os resultados com *flags* (série Bayer H.1 e Cell-Dyn 3000) [70]. Um perigo desta última orientação é que há laboratoristas inclinados a acreditar que sejam exatos todos os números produzidos pelos instrumentos do laboratório, mesmo com *flags*. No entanto, a maior preocupação é a ocorrência de contagens inexatas sem “alarmes”. Com todos os instrumentos, há eventuais resultados sem *flags*, apesar da presença de eritroblastos, granulócitos imaturos, linfócitos atípicos e, ocasionalmente, até mesmo blastos.

A conservação do sangue à temperatura ambiente – por exemplo, durante o transporte de clínicas distantes ou de hospitais-satélite – causa determinações inexatas, mas o tempo necessário para que ocorra essa inexatidão difere de acordo com os instrumentos e com os tipos de células. Os efeitos da conservação em geral são maiores nos contadores de impedância do que nos de dispersão da luz após citoquímica. As alterações decorrentes da estocagem são muito menores se a amostra for conservada a 4°C sempre que se antecipar alguma demora no processamento.

Fórmulas leucocitárias de dois ou três tipos celulares em contadores automatizados baseados em impedância

Obviamente, contagens diferenciais em duas e três partes não identificam aumento de eosinófilos ou de basófilos, e contagens diferenciais em duas

partes não identificam monocitose. A perda de informações clinicamente úteis não é grande, pois a maioria das contagens diferenciais é realizada para detectar alterações das contagens de neutrófilos e de linfócitos. A contagem de “monócitos” ou “células mononucleares” também não é muito exata, pois alguns eosinófilos, basófilos e neutrófilos são incluídos nessa categoria [71]. Contagens diferenciais automatizadas em três partes, nos contadores Coulter e em outros instrumentos de impedância, podem ser inexatas dentro dos primeiros 30 minutos da coleta, tornando-se novamente inexatas depois do sangue ter sido conservado à temperatura ambiente por mais de 6 horas. Há, então, uma queda da contagem de neutrófilos e uma elevação da contagem de “células mononucleares”, que aumenta com o tempo.

A maioria das amostras contendo eritroblastos, blastos, granulócitos imaturos e linfócitos atípicos apresenta *flags* em contadores automatizados diferenciais em três partes.

Fórmulas leucocitárias com cinco a sete tipos celulares

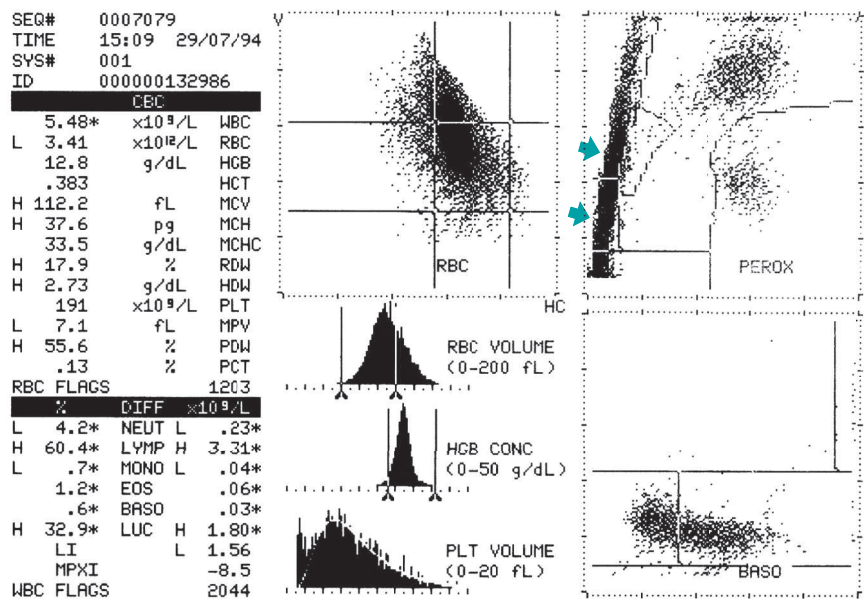
Contagem diferencial nos instrumentos das séries Bayer H.1 e Advia

Como as séries H.1 e Advia dos instrumentos Siemens baseia a contagem diferencial de leucócitos não apenas na dispersão da luz, mas também na citoquímica da peroxidase, serão emitidas contagens

TABELA 4.12 Algumas causas de erro na fórmula leucocitária nos instrumentos das séries Bayer H.1 e Advia Siemens

Mecanismo	Contagens com resultado falso
Falta de lise dos eritrócitos	Aumento de linfócitos e baixa de neutrófilos (Figura 4.4)
Deficiência de peroxidase nos neutrófilos; raramente, em pessoas saudas, afeta apenas uma fração dos neutrófilos [72]	Baixa de neutrófilos; aumento de monócitos e de LUCs (Figura 4.5)
Deficiência de peroxidase nos eosinófilos	Baixa de eosinófilos; aumento de neutrófilos, de monócitos ou de LUCs (Figura 4.6)
Deficiência de peroxidase nos monócitos	Baixa de monócitos e aumento de LUCs (Figura 4.7)
Monócitos displásicos identificados como neutrófilos	Baixa de monócitos e aumento de neutrófilos [73]
Cluster de neutrófilos identificado como de eosinófilos	Baixa de neutrófilos e aumento de eosinófilos (Figura 4.8)
Blastos leucêmicos ou células em maturação com forte atividade de peroxidase identificados como eosinófilos	Aumento de eosinófilos [74]
Promielócitos hipergranulares identificados como eosinófilos	Aumento de eosinófilos
Cluster de eosinófilos não identificado, geralmente devido à redução do número de grânulos	Baixa de eosinófilos e aumento de neutrófilos [75]
Grande resíduo de células no canal de basófilos, pela presença de eritroblastos, blastos, células de linfoma, células de mieloma [73] ou outras células anormais, ou causada pela coincidência, pela presença de heparina ou pela conservação da amostra a 4°C [76]	Aumento de basófilos (Figuras 4.9 e 4.10)
Contaminação da amostra com gordura subcutânea	Aumento de linfócitos, monócitos e neutrófilos [1]
Conservação da amostra > 24 horas	Flag “desvio à esquerda”

LUCs, células grandes não coradas.



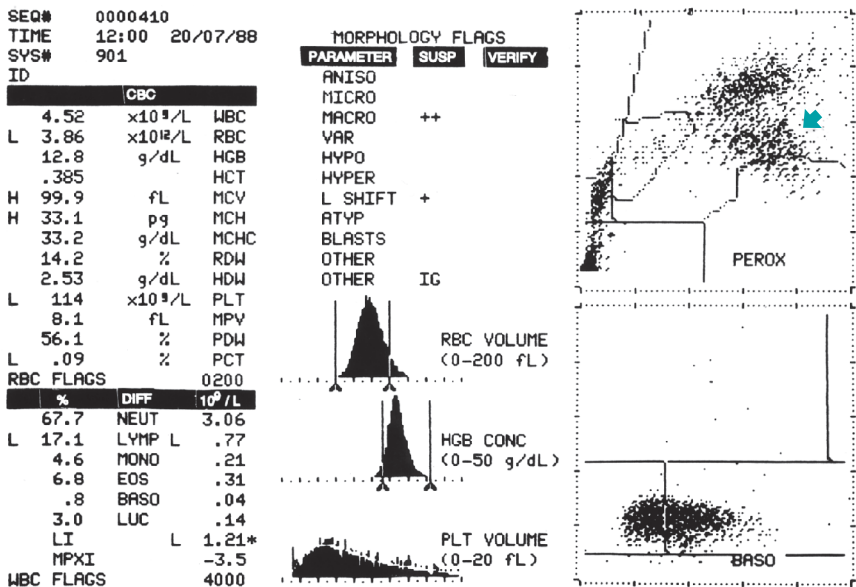


FIGURA 4.6 Scatter plots leucocitários no Bayer H.2 de paciente com deficiência parcial de peroxidase nos eosinófilos, mostrando um cluster de eosinófilos (seta verde) que não foi reconhecido. Cerca de dois terços dos eosinófilos foram identificados como neutrófilos.

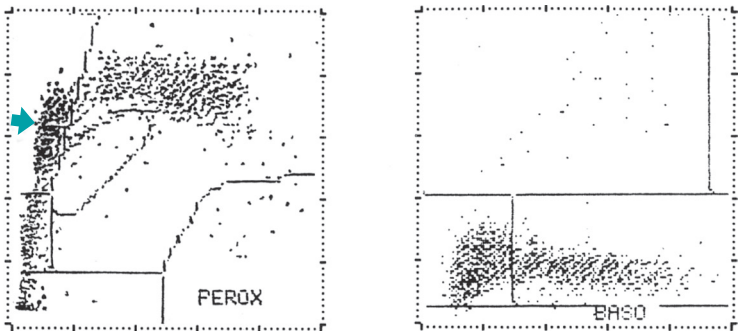


FIGURA 4.7 Scatter plots leucocitários no Bayer H.2 de um paciente com deficiência da peroxidase dos monócitos produzindo contagem de monócitos errada. Quase todos os monócitos foram contados como células grandes não coradas (seta verde). A contagem automatizada de monócitos foi de $0,09 \times 10^3/\mu L$, enquanto ao microscópio foi de $0,5 \times 10^3/\mu L$.

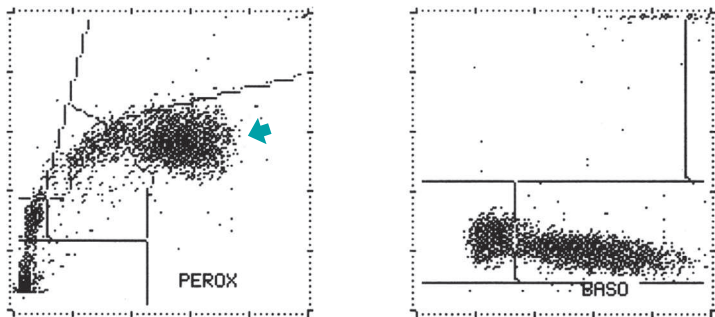


FIGURA 4.8 Scatter plots leucocitários no Bayer H.1 mostrando neutrófilos que produziram menor dispersão frontal da luz do que o normal (seta verde), tendo sido erroneamente classificados como eosinófilos.

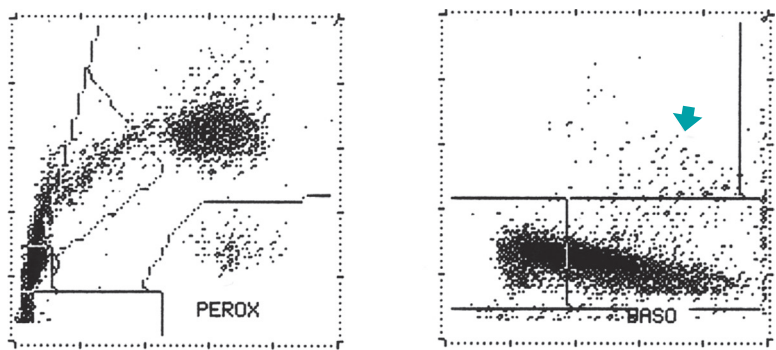


FIGURA 4.9 Scatter plots leucocitários no Bayer H.2 de um paciente com linfoma folicular, mostrando pseudobasofilia pela classificação errônea das células linfomatosas (seta verde) como basófilos.

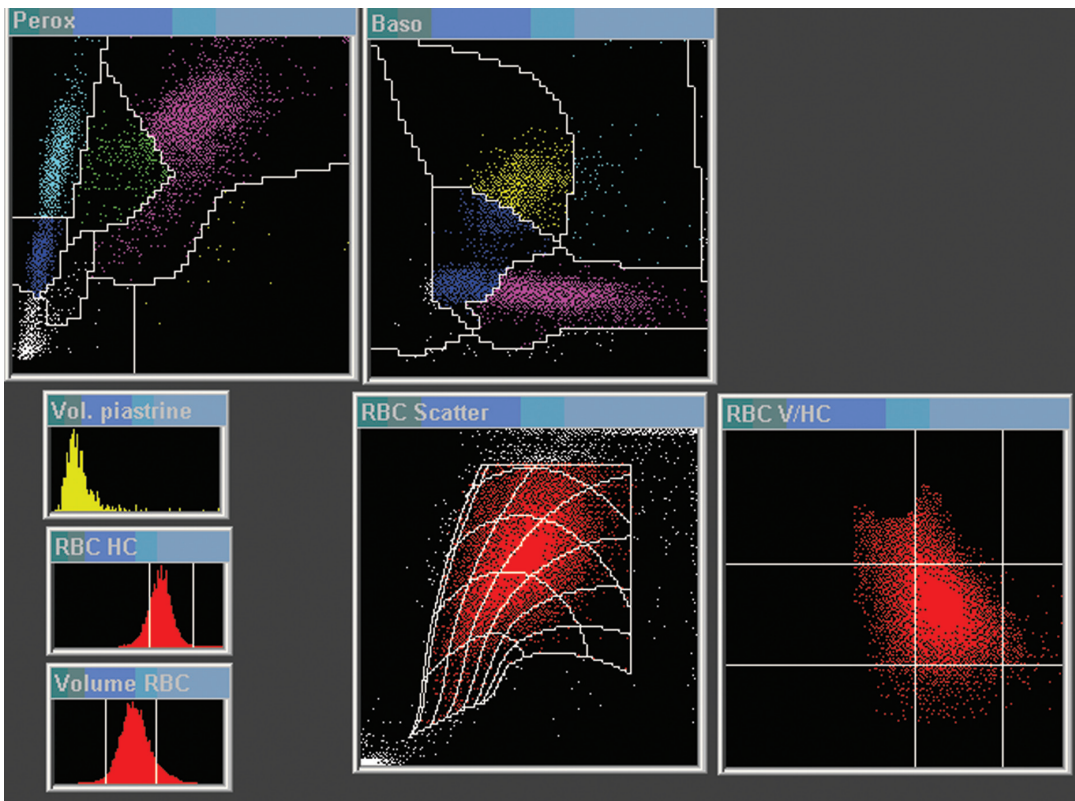


FIGURA 4.10 Scatter plots e histogramas produzidos pelo Siemens Advia 120 com uma amostra de sangue de paciente com linfoma difuso de grandes células B mostrando basofilia como resultado de células linfomatosas circulantes. O canal lobularidade/basófilos (no centro, parte superior) mostra um compacto *cluster* anormal de sinais que se estende da área mononuclear (azul) para cima, área dos basófilos (amarela); a contagem de basófilos foi $0,95 \times 10^3/\mu\text{L}$ (15,9%). No canal de peroxidase (parte superior, à esquerda) as células linfomatosas aparecem na área LUC (turquesa); a contagem foi $1,41 \times 10^3/\mu\text{L}$ (23,5%). Houve *flags* para linfócitos atípicos, blastos e desvio à esquerda. Outras anormalidades mostradas pelos histogramas e citogramas da série eritroide são: aumento de células hipocrômicas e de macrócitos, incluindo macrócitos hipocrômicos (em RBC V/HC). Cortesia da Professora Gina Zini, Roma.

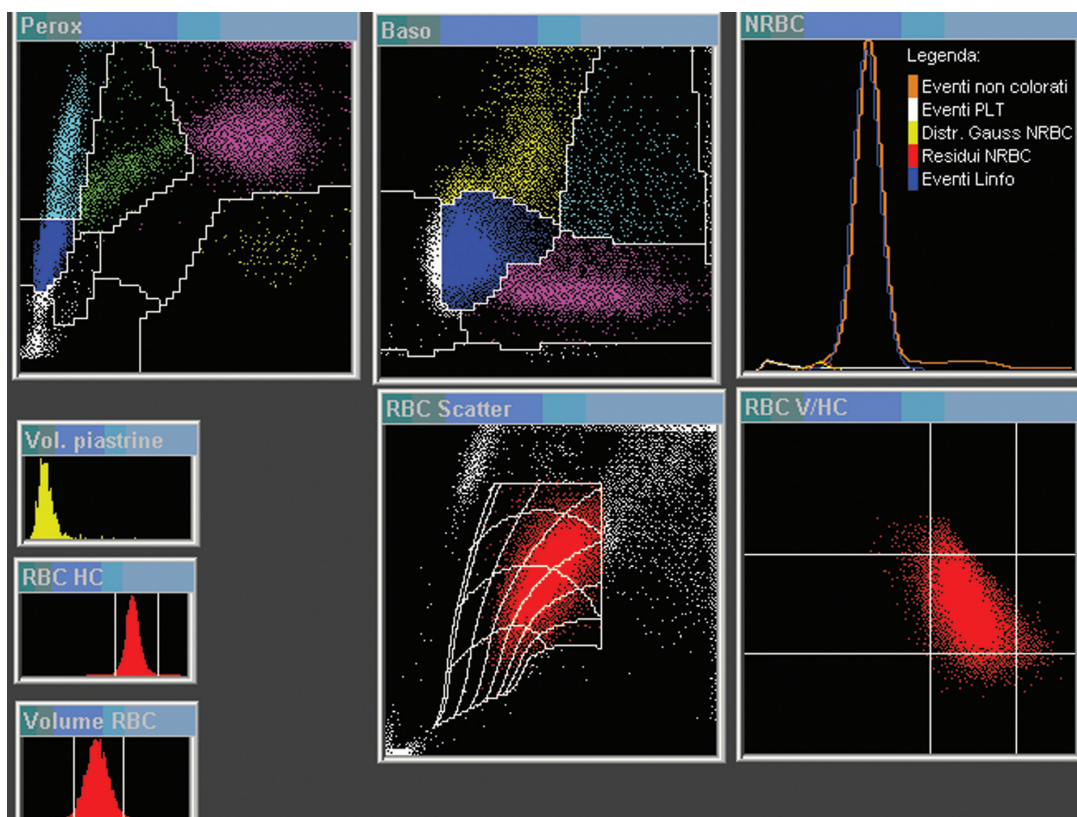


FIGURA 4.11 Citogramas e histogramas produzidos pelo Siemens Advia de paciente com linfoma de linhagem T. O hemograma mostrou leucócitos $74,6 \times 10^3/\mu\text{L}$, neutrófilos $7,23 \times 10^3/\mu\text{L}$, linfócitos $58,4 \times 10^3/\mu\text{L}$, monócitos $1,35 \times 10^3/\mu\text{L}$, eosinófilos $0,2 \times 10^3/\mu\text{L}$, basófilos $2,7 \times 10^3/\mu\text{L}$, LUCs (células grandes não coradas [i.e., peroxidase-negativa]) $4,7 \times 10^3/\mu\text{L}$. Havia *flag* para blastos (+) e linfócitos atípicos (+). Os *Perox scattergrams* mostram que há uma população anormal estendendo-se da caixa de linfócitos para dentro da caixa de LUCs. Isso é um indicativo de que a basofilia é falsa. A população anormal pode ser vista no *Baso scattergram* estendendo-se da caixa de linfócitos para a de basófilos. Cortesia da Professora Gina Zini.

maior dispersão do que na fórmula diferencial de três partes feita pelo Coulter S Plus IV. Em instrumentos Cobas, foi descrita uma superestimativa das contagens de monócitos [79]; em outro estudo, o Beckman-Coulter LH 750 mostrou boa concordância com contagens obtidas por citometria em fluxo com anticorpos monoclonais anti-CD14/CD45 [77].

Os efeitos da estocagem variam de acordo com os instrumentos. A exatidão da contagem diferencial do Coulter STKS piora um pouco depois de 6 a 8 horas de armazenamento à temperatura ambiente, com queda significativa das contagens de monócitos e de eosinófilos e com elevação da contagem de linfócitos [80], enquanto os instrumentos Bayer mostram melhor estabilidade. Com o Coulter Gen S, há aumento das contagens de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos e queda na contagem de

monócitos, a partir do primeiro para o segundo dia de estocagem à temperatura ambiente [36]. Alguns instrumentos Sysmex – por exemplo, o NE-8000 – têm mostrado um aumento acentuado da contagem de monócitos após armazenamento por 8 horas à temperatura ambiente e uma elevação da contagem de neutrófilos depois de 24 horas [81]. O Cobas Argos 5 Diff mostra elevação significativa da contagem de linfócitos e queda da contagem dos outros tipos de leucócitos entre 6 e 24 horas [82]. Os efeitos da estocagem podem ser diferentes em certos tipos de espécimes: um trabalho com o contador Sysmex NE-8000 constatou que em pacientes HIV-positivos a contagem de linfócitos diminuía depois de 24 horas à temperatura ambiente [83].

Sangues com características anormais podem causar inexatidões, como mostra a Tabela 4.13.

TABELA 4.13 Algumas causas de erro na fórmula leucocitária feita em instrumentos de impedância e impedância/dispersão da luz*

Defeito	Alterações falsas nas contagens	Instrumento em que foram notados
Alguns ou muitos neutrófilos contados como monócitos, geralmente após conservação > 24 h	Aumento de monócitos e baixa de neutrófilos	Sysmex NE-1500 e NE-8000 [84, 85]
Efeitos da conservação à temperatura ambiente	Baixa de neutrófilos e de monócitos e aumento de linfócitos após 24 h	Abbott Cell-Dyn 3500 [13]
	Baixa de neutrófilos e aumento de linfócitos após mais de 18 h	Coulter STKS [58]
	Baixa de neutrófilos e aumento de monócitos	Sysmex NE-1500 e NE-8000 (ver acima)
	Aumento significativo de linfócitos em menos de 24 h e baixa de eosinófilos	Cobas Argos 5 Diff [82]
Agregação de neutrófilos	Baixa da contagem de leucócitos e da porcentagem de neutrófilos e aumento da porcentagem de linfócitos	Todos
Agregação de linfócitos	Aumento da porcentagem de neutrófilos	Coulter STKS [87]
Falta de lise dos eritrócitos	Aumento da contagem de leucócitos e linfócitos	
Eritrócitos neonatais		Coulter STKS [88]
Hiperlipidemia		Coulter STKS
Hemoglobinas anormais (C, S, D, G)		Sysmex NE-8000
Icterícia obstrutiva		Sysmex NE-8000
Síndromes mielodisplásicas		Coulter STKS
Parasitas da malária	Aumento de linfócitos e monócitos	Sysmex NE-8000
Malária (mais com <i>P. vivax</i> que com <i>P. falciparum</i>)	Pseudoeosinofilia	Sysmex XE-2100 [89]
Malária (neutrófilos com pigmento contados como eosinófilos; raramente, parasitos com pigmento em eritrócitos não lisados também contados)	Aumento de eosinófilos e baixa de neutrófilos (pois o pigmento polariza a luz)	Cell-Dyn 3500 [90, 91]
Interferência plasmática	Aumento de eosinófilos	Coulter STKS [80]
Neutrófilos com hemossiderina contados como eosinófilos	Aumento de eosinófilos e baixa de neutrófilos	Cell-Dyn CD3700 [92]
Eosinófilos hipogranulares contados como neutrófilos	Baixa de eosinófilos e aumento de neutrófilos	Sysmex NE-8000 [75] Coulter STKS [93]
Neutrófilos hipogranulados ou hipolobulados contados como linfócitos	Baixa de neutrófilos	Horiba
Neutrófilos hipogranulados contados como monócitos	Baixa de neutrófilos e aumento de monócitos	Sysmex XE-2100 [94]
Outras células contadas como basófilos	Aumento de basófilos (pseudobasofilia)	
Linfócitos anormais em infecção por HIV		Coulter STKS [95]
Tipo celular não especificado		Coulter STKS [80]
Mieloblastos		Sysmex NE-8000 [96]
Promielócitos em leucemia promielocítica aguda		Sysmex NE-8000 [97]
Várias células anormais		Cell-Dyn 3000 [98]
Linfoblastos e mieloblastos		Coulter STKS [99]
Neutrófilos displásicos		Coulter STKS [73]

(continua)

TABELA 4.13 Algumas causas de erro na fórmula leucocitária feita em instrumentos de impedância e impedância/dispersão da luz* (Continuação)

Defeito	Alterações falsas nas contagens	Instrumento em que foram notados
Linfócitos atípicos e de linfoma, mieloblastos, promielócitos leucêmicos		Horiba
Linfócitos atípicos		Sysmex XE-2100 e XE-2100D [100]
Neutrófilos na síndrome de Maroteaux-Lamy		Sysmex XE-2100 [101]
Basófilos contados como linfócitos em alguns casos de leucemia mieloide crônica	Baixa de basófilos	Coulter STKS [80]
Várias células anormais contadas como monócitos-lyfócitos: células em leucemia linfocítica crônica, células de linfoma, mieloblastos, linfoblastos e promielócitos hipergranulares	Aumento de monócitos	Horiba
Linfócitos da mononucleose infecciosa		Coulter STKS e Sysmex NE-8000 [102]
Células de mieloma		Sysmex SE-9000 [73]
Separação imperfeita dos clusters de leucócitos	Alguns eosinófilos contados como neutrófilos, alguns neutrófilos contados como monócitos, pseudobasofilia	Coulter STKS [82, 103]
Plaquetas gigantes contadas como linfócitos	Aumento de linfócitos	Coulter STKS [103]
Eritroblastos contados como linfócitos	Aumento de linfócitos	Horiba
Infusões intravenosas de lipídios causando alterações celulares	Baixa de neutrófilos e aumento de monócitos	Coulter LH 750 [104]

*Esta lista de causas de erro, embora abrangente, não deve ser considerada como completa.

Erros nas contagens automatizadas de reticulócitos

Contagens automatizadas de reticulócitos tornam-se falsamente aumentadas quando há autofluorescência ou quando se produz fluorescência pela ligação do fluorocromo com algo que não seja o RNA dos reticulócitos, em geral DNA ou RNA de outras células. Há menos informações sobre contagens erradas com colorações não fluorescentes do ácido nucleico. Uma tendência à subestimativa dos reticulócitos com coloração com novo-azul-de-metileno foi notada em casos de hemoglobinopatia H [105], e uma elevação falsa na presença de alta contagem de eritroblastos, com coloração com oxazina 750 [106]. Com coloração com novo-azul-de-metileno, contagens falsamente elevadas foram observadas em algumas amostras quando o período de incubação foi prolongado além do recomendado [105]. Algumas das causas conhecidas de contagens de reticulócitos falsamente elevadas são apresentadas na Tabela 4.14. A inexatidão da contagem de reticulócitos pela presença de eritroblastos depende do

TABELA 4.14 Algumas causas de falso aumento na contagem automatizada de reticulócitos

Autofluorescência aumentada Amostras de sangue neonatal e pós-esplenectomia [107] Corpos de Heinz [108]
Ligação do corante fluorescente a elementos alheios ao RNA dos reticulócitos Alta contagem de leucócitos ou de eritroblastos e/ou leucócitos anormais, como em leucemia linfocítica crônica [109], leucemia mieloide aguda [110], leucemia aguda bifenotípica [110] e leucemia mieloide crônica (fase crônica ou crise blástica) [110] Corpos de Howell-Jolly [111] Células falciformes irreversíveis [104] Crioaglutininas [107] Plaquetas gigantes [107] Parasitas da malária [112] Parasitas da babesiose Corpos de Heinz [113] Autofluorescência devida a porfiria ou drogas [12]
Ligação do corante não fluorescente a elementos alheios ao RNA dos reticulócitos Eritroblastos [106] Eritrócitos microcíticos [114]w

método; um estudo mostrou-a mais provável com o XE-2100 do que com o Pentra 120 Retic [115]. Eritrócitos parasitados por *Plasmodium* podem levar a um histograma reticulocitário bimodal, sugerindo o diagnóstico [116, 117]; há, também, uma elevação espúria da fração reticulocítica imatura [117].

Foram notadas contagens erroneamente baixas de reticulócitos no sangue obtido de pacientes que tinham feito angiografia fluorescente da retina [118]. A quantificação dos reticulócitos de alta fluorescência é afetada pelos leucócitos e pode ser falseada quando houver leucocitose [119]. Os índices reticulocíticos podem ser inacurados na presença de plaquetas gigantes [120]. Uma contagem de reticulócitos falsamente elevada pode acompanhar-se de falsa elevação da fração reticulocítica imatura [110].

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências

- Whiteway A and Bain BJ (1999) Artefactual elevation of an automated white cell count following femoral vein puncture. *Clin Lab Haematol*, **21**, 65–68.
- Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD and Dafos F (1994) Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood*, **84**, 1851–1856.
- Bain BJ and Liesner R (1996) Pseudopyropoikilocytosis: a striking artefact. *J Clin Pathol*, **49**, 772–773.
- Cornet E, Behier C and Troussard X (2012) Guidance for storing blood samples in laboratories performing complete blood count with differential. *Int J Lab Hematol*, **34**, 655–660.
- Criswell KA, Breider MA and Bleavins MR (2001) EDTA-dependent platelet phagocytosis: a cytochemical, ultrastructural, and functional characterization. *Am J Clin Pathol*, **115**, 376–384.
- Fohlen-Walter A, Jacob C, Lecompte T and Lesesve J-F (2002) Laboratory identification of cryoglobulinemia from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films. *Am J Clin Pathol*, **117**, 606–614.
- Machicao CN, Schaub CR and Farhi DC (1988) Circulating mucin in breast carcinoma and automated leukocyte counts. *Hematol Pathol*, **2**, 159–161.
- Todd A, Pardoe L and O'Brian R (2010) Unexpected blood abnormalities following chemoembolisation. *Br J Haematol*, **150**, 500.
- Lesesve JF, Khalifa MA, Denoyes R and Braun F (2009) Peripheral blood candidosis infection leading to spurious platelet and white blood cell counts. *Int J Lab Hematol*, **31**, 572–576.
- Branda JA and Kratz A (2006) Effects of yeast on automated cell counting. *Am J Clin Pathol*, **126**, 248–254.
- Kim HR, Park BRG and Lee MK (2008) Effects of bacteria and yeast on WBC counting in three automated hematology counters. *Ann Hematol*, **87**, 557–562.
- Zandecki M, Genevieve F, Gerard J and Godon A (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol*, **1**, 21–41.
- Wood BL, Andrews J, Miller S and Sabath DE (1999) Refrigerated storage improves the stability of the complete blood count and automated differential. *Am J Clin Pathol*, **112**, 687–695.
- Brigden MI and Dalal BI (1999) Cell counter-related abnormalities. *Lab Med*, **30**, 325–334.
- Hoffmann EDTA-induced pseudo-neutropenia resolved with kanamycin. *Clin Lab Haematol*, **23**, 193–196.
- Anonymous (2009) Chemical-associated artifacts. *Blood*, **113**, 4487.
- Zandecki M, Genevieve F, Gerard J and Godon A (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol*, **1**, 4–20.
- Bizzaro N (1993) Granulocyte aggregation is edetic acid and temperature dependent. *Arch Pathol Lab Med*, **117**, 528–530.
- Glasser L (2005) Pseudo-neutropenia secondary to leukoagglutination. *Am J Hematol*, **80**, 147.
- Grimaldi E and Scopacasa F (2000) Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol*, **113**, 497–505.
- McMullin ME, Wilkin HJ and Elder E (1999) Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenström's macroglobulinaemia. *J Clin Pathol*, **48**, 787.
- Weiss GB and Besman JD (1984) Spurious automated red cell values in warm autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*, **17**, 433–435.
- Vagace JM, Rodriguez MÁ, de la Maya MD and Geravasini G (2013) Ethylenediaminetetraacetic acid-dependent pseudomacrocytosis. *J Clin Pathol*, **66**, 811–814.
- Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV, Siourounis PV, Stamulakatos AK, Premitis EE *et al.* (1993) The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume. A proposed method for the comparative assessment of this effect among various haematology analysers. *Clin Lab Haematol*, **16**, 235–245.
- Bryner MA, Houwen B, Westengard J and Klein O (1997) The spun micro-haematocrit and mean red cell volume are affected by changes in the oxygenation state of red blood cells. *Clin Lab Haematol*, **19**, 99–103.

- 26 Ali CYA (2000) Blood substitutes – clinical applications and impact of the laboratory. Paper presented at 24th World Congress of Medical Technology, Vancouver, Canada.
- 27 Nosanchuk JS, Roark MF and Wanser C (1974) Anemia masked by triglyceridemia. *Am J Clin Pathol*, **62**, 838–839.
- 28 Miller CE, Hirani B and Bain BJ (2013) Hyperlipidaemia revealed by erythrocyte morphology. *Am J Hematol*, **88**, 625.
- 29 Nicholls PD (1977) The erroneous haemoglobin-hyperlipidaemia relationship. *J Clin Pathol*, **30**, 638–640.
- 30 Fohlen-Walter A, Goupil JJ, Lecompte T and Lesesve J-F (2002) Underestimation of haemoglobin concentration in blood samples with high hyperleukocytosis: case report and alternative method for determination on blood cells automated analysers. *Haematologica*, **87**, ELT40.
- 31 Brigden ML, Page NE and Graydon C (1993) Evaluation of the Sysmex NE-8000 automated hematology analyzer in a high-volume outpatient laboratory. *Am J Clin Pathol*, **100**, 618–625.
- 32 Lewis SM, Bainbridge I, McTaggart P, Garvey BJ, England JM and Perry TE (1992) *MDD Evaluation Report: Cobas Argos 5 Diff Automated Hematology Analyser*. London: Medical Devices Directorate.
- 33 Beautyman W and Bills T (1974) Osmotic error in measurements of red cell volume. *Lancet*, **ii**, 905–906.
- 34 Strauchen JA, Alston W, Anderson J, Gustafson Z and Fajardo LF (1981) Inaccuracy in automated measurement of hematocrit and corpuscular indices in the presence of severe hyperglycemia. *Blood*, **57**, 1065–1067.
- 35 Hinchliffe RF, Bellamy GJ and Lilleyman JS (1992) Use of the Technicon HI hypochromia flag in detecting spurious macrocytosis induced by excessive K2EDTA concentration. *Clin Lab Haematol*, **14**, 268–269.
- 36 Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W and Schwarting R (2002) Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med*, **126**, 336–342.
- 37 Bannister N, Bannister E and Besser M (2011) High incident [sic] of pseudothrombocytopenia after cardiopulmonary bypass. *Br J Haematol*, **153**, Suppl. 1, 85.
- 38 Choe W-H, Cho Y-U, Chae J-D and Kim S-H (2013) Pseudothrombocytopenia or platelet clumping as a possible cause of low platelet count in patients with viral infection: a case series from single institution focusing on hepatitis A virus infection. *Int J Lab Haematol*, **35**, 70–76.
- 39 Lesesve J-F, Latger-Cannard V and Lecompte T (2005) Pseudo-storage pool disease due to platelet degranulation in EDTA-collected peripheral blood: a rare artifact. *Clin Lab Haematol*, **27**, 336–342.
- 40 Nomoto Y, Hirose Y, Tanaka T, Kinoshita H and Yamazaki Y (2007) Heparin-induced thrombocytopenia, anomalous laboratory findings lead to the correct diagnosis. *Am J Hematol*, **82**, 499–500.
- 41 Bonifazi F, Stanzani M and Bandini G (1999) A case of pseudothrombocytosis. *Haematologica*, **84**, 275.
- 42 Savage DG and Kolevska T. Microspherocytosis and pseudothrombocytosis after severe burns. <http://www.bloodmed.com/home/slide-popup.asp?id=118> (accessed April 2014).
- 43 Akwari AM, Ross DW and Stass SA (1982) Spurious elevated platelet counts due to microspherocytosis. *Am J Clin Pathol*, **77**, 220–221.
- 44 Delgado J, Jimenez C, Larrocha C and Vilorio A (2002) Cryoglobulinemia detected as a PIC/POC discrepancy of the automated complete blood count. *Eur J Haematol*, **69**, 65–66.
- 45 Kabutomori O, Iwatani Y and Kabutomori M (1999) Effects of hypertriglyceridemia on platelet counts in automated hematology analysis. *Ann Intern Med*, **130**, 1152.
- 46 Cuignet OY, Wood BL, Chandler WL and Spiess BD (2000) A second-generation blood substitute (Perfluorodichlorooctane emulsion) generates spurious elevations in platelet counts from automated hematology analyzers. *Anesth Analg*, **90**, 517–522.
- 47 Gloster ES, Strauss RA, Jimenez JF, Neuberg RW, Berry DH and Turner EJ (1985) Spurious elevated platelet counts associated with bacteremia. *Am J Hematol*, **18**, 329–332.
- 48 Latif S, Veillon DM, Brown D, Kaltenbach J, Curry S, Linscott AJ *et al.* (2003) Spurious automated platelet count: enumeration of yeast forms as platelets by the Cell-DYN 4000. *Am J Clin Pathol*, **120**, 882–885.
- 49 Kakkar N (2004) Spurious rise in the automated platelet count because of bacteraemia. *J Clin Pathol*, **57**, 1096–1097.
- 50 Arnold JA, Jowzi Z and Bain BJ (1999) Images in haematology: *Candida glabrata* in a blood film. *Br J Haematol*, **104**, 1.
- 51 Crabbe G, van Poucke M and Cantineaux B (2002) Artefactually-normal automated platelet counts due to malaria-infected RBC. *Clin Lab Haematol*, **24**, 179–182.
- 52 Maurer-Spurej E, Pittendreich C, Yakimec J, De Bady MH and Chipperfield K (2010) Erroneous automated optical platelet counts in 1-hour post-transfusion blood samples. *Int J Lab Haematol*, **32**, e1–8.
- 53 Segal HC, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ and Murphy MF (2005) Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br J Haematol*, **128**, 520–525.
- 54 Bowles KM, Bloxham DM, Perry DJ and Baglin TP (2006) Discrepancy between impedance and immunofluorescence platelet counting has implications for clinical decision making in patients with idiopathic thrombocytopenia purpura. *Br J Haematol*, **134**, 320–322.
- 55 Kim SY, Kim JE, Kim HK, Han KS and Toh CH (2010) Accuracy of platelet counting by automated hematology analyzers in acute leukemia and disseminated intravascular coagulation: potential effects of platelet activation. *Am J Clin Pathol*, **134**, 634–647.

- 56 Fiorin F, Steffan A, Pradella P, Bizzaro N, Potenza R and de Angelis V (1998) IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol*, **110**, 178–183.
- 57 Hsieh AT, Chao TY and Chen YC (2003) Pseudothrombocytopenia associated with infectious mononucleosis. *Arch Pathol Lab Med*, **127**, e17–e18.
- 58 Campbell V, Fosbury E and Bain BJ (2009) Platelet phagocytosis as a case of pseudothrombocytopenia. *Am J Hematol*, **84**, 362.
- 59 Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T and Nakahara K (1997) Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Br J Haematol*, **99**, 817–823.
- 60 Schuff-Werner P, Steiner M, Fenger S, Gross HJ, Bierlich A, Dreissiger K *et al.* (2013) Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *Br J Haematol*, **162**, 684–692.
- 61 Braester A (2003) Pseudothrombocytopenia as a pitfall in the treatment of essential thrombocythemia. *Eur J Haematol*, **70**, 251–252.
- 62 Stiegler HM, Fischer Y and Steiner S (1999) Thrombocytopenia and glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonists. *Lancet*, **353**, 1185.
- 63 Jubelirer SJ, Koenig BA and Bates MC (1999) Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am J Hematol*, **61**, 205–208.
- 64 Paterakis G, Konstantopoulos K and Loukopoulos D (1994) Spuriously increased platelet count due to microcyte interference: value of the R-1000 (Sysmex) Reticulocyte Analyzer. *Am J Hematol*, **45**, 57–58.
- 65 Shulman G and Yapit MK (1980) Whole blood platelet counts with impedance type particle counter. *Am J Clin Pathol*, **73**, 104–106.
- 66 van der Meer W, MacKenzie MA, Dinnissen JWB and de Keijzer MH (2003) Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol*, **56**, 772–774.
- 67 Stass SA, Holloway ML, Slease RB and Schumacher HR (1977) Spurious platelet counts in hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol*, **68**, 530–531.
- 68 Stass SA, Holloway ML, Peterson V, Creegan WJ, Gallivan M and Schumacher HR (1979) Cytoplasmic fragments causing spurious platelet counts in the leukemic phase of poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol*, **71**, 125–128.
- 69 Hammerstrom J (1992) Spurious platelet counts in acute leukaemia with DIC due to cell fragmentation. *Clin Lab Haematol*, **14**, 239–243.
- 70 Bentley SA, Johnson A and Bishop CA (1993) A parallel evaluation of four automated hematology analyzers. *Am J Clin Pathol*, **100**, 626–632.
- 71 Bain BJ (1986) An assessment of the three-population differential count on the Coulter Counter Model S Plus IV. *Clin Lab Haematol*, **8**, 347–359.
- 72 Hinchliffe R and Vora A (2006) A subject with populations of both peroxidase-positive and -negative neutrophils. *Br J Haematol*, **135**, 421.
- 73 Hur M, Lee YK, Lee KM, Kim HJ and Cho HI (2004) Pseudobasophilia as an erroneous white blood cell differential count with a discrepancy between automated cell counters: report of two cases. *Clin Lab Haematol*, **26**, 287–290.
- 74 Merino A and Esteve J (2005) Acute myeloid leukaemia with peculiar blast cell inclusions and pseudo-eosinophilia. *Br J Haematol*, **131**, 286.
- 75 Kabutomori O and Iwatani Y (1997) Unusual eosinophilia not detected by an automated analyser in a patient with liver cirrhosis. *J Clin Pathol*, **50**, 967–968.
- 76 Bizzaro N (1996) Pseudobasophilia in the Technicon automated cell counters. *Clin Lab Haematol*, **18**, 298–299.
- 77 Grimaldi E, Carandente P, Scopacasa F, Romano MF, Pellegrino M, Bisogni R and de Caterina M (2005) Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clin Lab Haematol*, **27**, 91–97.
- 78 Cohen AI, Peerschke EIB and Steigbigel RT (1993) A comparison of the Coulter STKS, Coulter S+IV, and manual analysis of white cell differential counts in a human immunodeficiency virus-infected population. *Am J Clin Pathol*, **100**, 611–617.
- 79 Bentley SA, Johnson TS, Sohler CH and Bishop CA (1994) Flow cytometric differential leucocyte analysis with quantification of neutrophil left shift: an evaluation of the Cobas- Helios Analyzer. *Am J Clin Pathol*, **102**, 223–230.
- 80 Robertson EP, Lai HW and Wei DCC (1992) An evaluation of leucocyte analysis on the Coulter STKS. *Clin Lab Haematol*, **14**, 53–68.
- 81 Hu C-Y, Wang C-H, Chuang H-M and Shen M-C (1993) Evaluation of performance for automated differential leucocyte counting on Sysmex NE-8000 by NCCLS recommended protocol H20-T. *Clin Lab Haematol*, **15**, 287–299.
- 82 Sheridan BL, Lollo M, Howe S and Bergeron N (1994) Evaluation of the Roche Cobas Argos 5 Diff automated haematology analyser with comparison with Coulter STKS. *Clin Lab Haematol*, **16**, 117–130.
- 83 Koepke JA and Smith-Jones M (1992) Lymphocyte counting in HIV-positive individuals. *Sysmex J Int*, **2**, 71–74.
- 84 Theodorsen L (1995) Evaluation of monocyte counting with two automated instruments by the use of CD14-specific immunomagnetic Dynabeads. *Clin Lab Haematol*, **17**, 225–229.
- 85 Bartels PCM and Schoorl M (1998) Time dependent increase of differential monocyte count on the Sysmex NE-2000. *Clin Lab Haematol*, **20**, 165–168.
- 86 Warner BA and Reardon DM (1991) Field evaluation of the Coulter STKS. *Am J Clin Pathol*, **95**, 207–217.

- 87 Shelton JB and Frank IN (2000) Splenic B lymphoma with lymphocyte clusters in peripheral blood smears. *J Clin Pathol*, **53**, 228–230.
- 88 Fournier M, Adenis C, Fontaine H, Camaille B and Goudemand J (1994) Evaluation and use of the white blood cell differential provided by the Coulter STKS in a children's hospital. *Clin Lab Haematol*, **16**, 33–42.
- 89 Jain M, Gupta S, Jain J and Grover RK (2012) Usefulness of automated cell counter in detection of malaria in a cancer set up—our experience. *Indian J Pathol Microbiol*, **55**, 467–473.
- 90 Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, Tana M, Munster M, Wypkema E *et al.* (1997) Automated malaria ascertainment by depolarization of laser light. *Proceedings of the 37th Annual Congress of the Federation of South African Societies of Pathology*, 145.
- 91 Hanscheid T, Pinto BG, Cristino JM and Grobusch MP (2000) Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500™: what does the instrument detect? *Clin Lab Haematol*, **22**, 259–261.
- 92 Roberts GT, Perry JL, Al-Jefri A and Scott CS (2005) Intraleukocytic hemosiderin inclusions detected as pseudo eosinophils by automated depolarization analysis in a patient with beta-thalassaemia major and immune hemolysis. *Blood Cells Mol Dis*, **34**, 162–165.
- 93 Kim HJ, Lee YJ, Lee DS and Cho HI (1999) A case of idiopathic hypereosinophilic syndrome with hypersegmented and hypogranular eosinophils. *Clin Lab Haematol*, **21**, 428–430.
- 94 McIlwaine L, Parker A, Sandilands G, Gallipoli P and Leach M (2013) Neutrophil-specific granule deficiency. *Br J Haematol*, **160**, 735.
- 95 Germain PR and Lammers DB (1994) False basophil counts on the Coulter STKS. *Lab Med*, **25**, 376–379.
- 96 Sivakumaran M, Allen B and Wood JK (1994) Automated differential leucocyte counting on the Sysmex NE8000 analyser. *Clin Lab Haematol*, **16**, 206–207.
- 97 Meyepa LC, Tsoi G and Gan TE (1995) A new approach to the study of the blast suspect flag of the Sysmex NE 8000. *Aust NZ J Med*, **25**, 74.
- 98 Cornbleet PJ, Myrick D, Judkins S and Levy R (1992) Evaluation of the CELL-DYN 3000 differential. *Am J Clin Pathol*, **98**, 603–614.
- 99 Pettit AR, Grace P and Chu P (1995) An assessment of the Coulter VCS automated differential counter scatterplots in the recognition of specific acute leukaemia variants. *Clin Lab Haematol*, **17**, 125–129.
- 100 Jácomo RH, Lozano VF, Gastao da Cunha Neto J and Costa SS (2011) What's the meaning of basophilia in Sysmex XE-2100? *Arch Pathol Lab Med*, **135**, 415.
- 101 Piva E, Pelloso M, Ciubotaru D, Penello L, Burlina A and Plebani M (2013) The role of automated analyzers in detecting abnormal granulation of leucocytes in lysosomal storage diseases: Maroteaux-Lamy disease. *Am J Hematol*, **88**, 527.
- 102 Brigden ML, Au S, Thompson S, Brigden S, Doyle P and Tsaparas Y (1999) Infectious mononucleosis in an outpatient population: diagnostic utility of 2 automated hematology analyzers and the sensitivity and specificity of Hoagland's criteria in heterophile-positive patients. *Arch Pathol Lab Med*, **123**, 875–881.
- 103 Cornbleet PJ, Myrick D and Levy R (1993) Evaluation of the Coulter STKS five-part differential. *Am J Clin Pathol*, **99**, 72–81.
- 104 Wang J, Fan L, Ma C, Zhang Y and Xu D (2013) Effects of parenteral lipid emulsions on leukocyte numerical and morphological parameters determined by LH750 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, **35**, e4–e7.
- 105 Lai SK, Yow CMN and Benzil IFF (1999) Interference of Hb-H disease in automated reticulocyte counting. *Clin Lab Haematol*, **21**, 261–264.
- 106 Brugnara C, Hipps MJ, Irving PJ, Lathrop H, Lee PA, Minchello EM and Winkelman J (1994) Automated reticulocyte counting and measurement of reticulocyte cellular indices: evaluation of the Miles H3 blood analyzer. *Am J Clin Pathol*, **102**, 623–632.
- 107 Chin-Yee I, Keeney M and Lohmann RC (1991) Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. *Clin Lab Haematol*, **13**, 177–188.
- 108 Hinchliffe RF (1993) Error in automated reticulocyte counts due to Heinz bodies. *J Clin Pathol*, **46**, 878–879.
- 109 Ferguson DJ, Lee S-F and Gordon PA (1990) Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Hematol*, **33**, 13–17.
- 110 Kim A, Park J, Kim M, Lim J, Oh E-J, Kim Y *et al.* (2012) Correction of pseudoreticulocytosis in leukocytosis samples using the Sysmex XE-2100 analyzer depends on the type and number of white blood cells. *Ann Lab Med*, **32**, 392–398.
- 111 Lofness KG, Kohnke ML and Geier NA (1994) Evaluation of automated reticulocyte counts and their reliability in the presence of Howell-Jolly bodies. *Am J Clin Pathol*, **101**, 85–90.
- 112 Hoffman JJML and Pennings JMA (1999) Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin Lab Haematol*, **21**, 257–260.
- 113 Español I, Pedro C and Remache AF (1999) Heinz bodies interfere with automated reticulocyte counts. *Haematologica*, **84**, 373–374.
- 114 Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E and Rizzotti P (2000) Flow cytometric reticulocyte counting: parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol*, **115**, 100–111.
- 115 Briggs C, Grant D and Machin SJ (2001) Comparison of the automated reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction measurements obtained with the ABX Pentra 120 Retic blood cell analyzer and the Sysmex XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Haematol*, **7**, 1–6.
- 116 Mellors I, Hardy J, Lambert J, Kendall R and McArdule B (2001) Detection of intra-erythrocyte malarial parasites by an automated haematology analyser – a case study. *Br J Haematol*, **113**, Suppl. 1, 50.

- 117 Scott CS, van Zyl D, Ho E, Ruivo L, Kunz D and Coetzer TL (2002) Patterns of pseudo-reticulocytosis in malaria: fluorescent analysis with the Cell-Dyn® CD4000. *Clin Lab Haematol*, **24**, 15–20.
- 118 Hirata R, Morita Y, Hirai N, Seki M, Imanishi A, Toriumi J *et al.* (1992) The effects of fluorescent substances on the measurement of reticulocytes—using automated reticulocyte analyzers R-1000 and R-3000. *Sysmex J Int*, **2**, 10–15.
- 119 Villamor N, Kirsch A, Huhn D, Vives-Corrons JL and Serke S (1996) Interference of blood leucocytes in the measurements of immature red cells (reticulocytes) by two different (semi-) automated flow-cytometry technologies. *Clin Lab Haematol*, **18**, 89–94.
- 120 Bowen D, Williams K, Phillips I and Cavill I (1996) Cytometric analysis and maturation characteristics of reticulocytes from myelodysplastic patients. *Clin Lab Haematol*, **18**, 155–160.

CAPÍTULO 5

Valores de referência

A interpretação do resultado de qualquer exame laboratorial requer que se avalie se é ou não é normal. “Normal” significa que o resultado é o esperado naquele indivíduo quando está em perfeito estado de saúde (supondo-se que não tenha qualquer defeito genético que afete o sangue). Como raramente se dispõe de dados para essa afirmativa, costuma-se, em vez disso, considerar se o resultado é o que seria esperado em um indivíduo sadio, biologicamente tão parecido quanto possível com o indivíduo em questão. Resultados de exames eram convencionalmente comparados com “valores normais”, em geral obtidos de livros especializados, mas, às vezes, de origens obscuras. Mais recentemente, resultados de exames têm sido comparados com “valores de referência”; os conceitos que fundamentam a derivação de valores de referência são discutidos a seguir.

Um indivíduo selecionado segundo critérios definidos, dentro de uma população que inclui todos os indivíduos que satisfazem esses critérios, é dito indivíduo de referência. Uma amostra de referência é um número de indivíduos de referência, escolhidos para representar a população de referência. Valores de referência são resultados de exames feitos em indivíduos de referência, podendo ser analisados e descritos estatisticamente; eles incidirão dentro de certos limites e terão uma certa distribuição, com média, mediana e moda decorrentes. O conjunto de valores de referência é geralmente descrito em termos de limites de referência, que excluem 2,5% dos valores em cada extremo da distribuição observada, definindo o “intervalo de referência”, que representa os 95% centrais dos valores observados. Esse intervalo de referência, proveniente dos indivíduos da amostra, é considerado representativo do intervalo de referência da população da qual ele é oriundo; a precisão de concordância (*closeness of fit*) entre o intervalo da amostra e o intervalo da população pode ser representada pelos limites de confiança da média e de cada um dos dois limites de referência. A precisão de concordância é determinada pelo tamanho

da amostra e pela maneira, isenta ou não de tendenciosidade ou distorção (*bias*), como os indivíduos de referência foram escolhidos a partir da população de referência. Os indivíduos de referência podem provir da população de referência por amostragem aleatória ou ser selecionados de modo estratificado a fim de refletir exatamente diferentes idades, sexos, classes sociais e outras variáveis na população de referência. Os intervalos de referência são comumente representados pelos extremos e ditos “limites de referência”, expressão facilmente compreensível, apesar de não ser recomendada oficialmente.

Um indivíduo de referência não é necessariamente sadio, mas se os critérios para a seleção incluírem bom estado de saúde, os limites de referência tornam-se praticamente idênticos aos “limites normais” tradicionais, apenas com uma definição mais cuidadosa.

Para que determinados limites de referência sejam úteis na avaliação de resultados hematológicos, devem levar em conta se esses resultados são influenciados por idade, sexo ou origem étnica; se este for o caso, deverão ser obtidos limites de referência distintos para cada um desses estratos da população. Gestantes normalmente são excluídas, a menos que se queira obter limites específicos da gravidez. Limites de referência são geralmente derivados de resultados de exames obtidos em condições cuidadosamente controladas, com indivíduos em jejum e em repouso, que se abstiveram de álcool, fumo e drogas, e com amostras de sangue colhidas em uma hora definida do dia. Como tais condições não são satisfeitas pelas populações de pacientes, poderia ser estatisticamente mais correto utilizar indivíduos em deambulação, sem cuidados quanto ao jejum, cujos hábitos reflitam os da população da qual eles e os pacientes se originam. O local da coleta e outras variáveis técnicas na obtenção da amostra de sangue afetam os resultados dos exames hematológicos (Tabela 5.1). Por esse motivo, as amostras de sangue devem ser obtidas do mesmo modo que na população de

TABELA 5.1 Alguns efeitos da técnica de coleta de sangue sobre os parâmetros hematológicos*

Sítio de obtenção da amostra de sangue Durante a primeira semana de vida, E, Hb e Hct são aproximadamente 15% mais altos no sangue colhido por picada do que no sangue venoso; [†] a diferença pode ser maior em bebês com sepse e má circulação periférica [3]; VCM, HCM e RDW são os mesmos, mas a CHCM é mais alta [3]; em lactentes maiores, em crianças e em adultos, não há diferenças consistentes entre as amostras venosas e as de picada digital, mas amostras capilares do lóbulo da orelha mostram valores de E, Hb e Hct 6-17% mais altos que os de amostras venosas ou de picada digital Em recém-nascidos, o sangue de picada do calcanhar tem contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos cerca de 20% mais altas do que as de amostras venosas ou arteriais; as contagens aproximam-se mais das encontradas no sangue venoso quando o sangue verte espontaneamente do ponto picado e quando as primeiras gotas, à exceção da primeira, são usadas para a contagem; em adultos, as contagens de leucócitos e neutrófilos são significativamente mais altas em amostras de picada digital do que em amostras venosas, com uma queda progressiva com a sucessão de gotas [5]; em adultos a contagem de plaquetas é menor em amostras capilares e a Hb é mais alta [6] Em recém-nascidos, a contagem de plaquetas e o VPM são mais altos em amostras venosas do que em amostras capilares [3]
Posição do braço E, Hct e Hb são 2 a 3% mais altos quando o braço está pendente do que quando está ao nível da aurícula cardíaca
Uso do garrote A aplicação prolongada do garrote aumenta E, Hb e Hct em 2-3%
Natureza do anticoagulante A diluição causada pelo uso de um anticoagulante líquido causa ligeira redução das contagens celulares, da Hb e do Hct
Oxigenação do sangue A oxigenação do sangue baixa o Hct e o VCM e aumenta a CHCM [7]
Repouso prévio Após repouso de apenas meia hora na horizontal, ocorre uma redução de 5 a 8% de E, Hb e Hct; o repouso diminui a contagem de linfócitos [8]

E, contagem de eritrócitos; Hb, dosagem de hemoglobina; Hct, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração hemoglobinica corpuscular média; RDW, amplitude de distribuição (do volume) dos eritrócitos; VPM, volume plaquetário médio.

*Para outras referências relevantes, ver a primeira edição deste livro [1].

[†]Foi referido que, ao nascimento, a Hb capilar é mais alta do que a Hb do sangue do cordão [2], mas parece provável que essa diferença resulta da demora de 20 a 60 minutos até a coleta do sangue capilar.

pacientes, inclusive usando-se o mesmo anticoagulante (seco ou líquido).

O estabelecimento de limites de referência em uma amostra de população é um procedimento difícil e dispendioso, superior aos recursos de um laboratório particular. Contudo, os laboratórios devem, quando possível, estabelecer seus próprios limites, usando suas próprias técnicas e instrumentação. Limites de referência podem ser obtidos a partir de voluntários sadios, de indivíduos atendidos em serviços médicos de triagem ou que se submetem a exames médicos anuais, ou, a partir de exames de candidatos a emprego no próprio hospital. O pessoal que trabalha em hospitais não costuma ser ideal, pois a média de idade tende a ser consideravelmente mais baixa do que a da população de pacientes. Indivíduos que estão doando sangue pela primeira vez são satisfatórios para referência, mas os que doam sangue regularmente podem ter depleção dos estoques de ferro, o que afetará as cifras hematimétricas. É possível, ainda, derivar limites de referência de dados de pacientes, sob o pressuposto de que, para cada mensuração, os resultados dos exames representarão uma população normal e uma anormal, com certo grau de superposição. São

necessários grandes números, e a estatística é complexa [9].

A derivação de limites para idosos envolve problemas específicos devido à alta prevalência de doença, oculta ou conhecida. Seria desejável, se possível, separar os efeitos da incidência crescente de doenças dos efeitos do próprio processo de envelhecimento. De maneira análoga, no caso de um país em desenvolvimento, poderá ser difícil selecionar uma amostra populacional adequada, que não seja adversamente afetada por desnutrição e doenças subclínicas. Nessas circunstâncias, poderá ser necessário derivar valores de referência de indivíduos da “elite”, como exército, polícia, estudantes de medicina, médicos, enfermeiros e laboratoristas; esses indivíduos não serão típicos das comunidades das quais provêm, mas os resultados de seus exames estarão mais próximos daqueles que se esperaria encontrar em indivíduos com estado de saúde ideal. Também podem surgir problemas em populações com alta prevalência de doenças genéticas. Ao fixar limites para os parâmetros eritroides, é necessário excluir portadores de hemoglobinopatias e de traços talassêmicos. A exclusão da β -talassemia menor e das hemoglobinopatias não é difícil, dada

a facilidade do diagnóstico, mas a exclusão do traço α -talassêmico não é fácil, por requerer análise de DNA. Contudo, a menos que se proceda deste modo, não é possível distinguir diferenças étnicas genuínas de diferenças causadas pela alta prevalência desses distúrbios genéticos. Por isso, as pequenas diferenças na hemoglobina (Hb) e nos índices hematimétricos entre afro-americanos e americanos brancos são, provavelmente, decorrentes da prevalência de 25 a 30% do traço α -talassêmico entre os afro-americanos; contudo, mesmo quando são excluídos os efeitos da α -talassemia e da deficiência de ferro, a hemoglobina é cerca de 0,34 g/dL mais baixa em homens afro-americanos e 0,32 g/dL em mulheres afro-americanas do que em brancos [10]; essa diferença residual não é explicada por traço falciforme ou por diferenças socioeconômicas ou de função renal. Essas diferenças são suficientes para classificar como anêmicos 6% das mulheres afro-americanas e 8% dos homens afro-americanos se forem usados valores de referência para brancos [10]. Diferenças similares são vistas em crianças afro-americanas, que tem Hb 0,2-0,7 g/dL mais baixa do que controles brancos não hispânicos de idade correspondente [11]. Estudos em populações italianas geneticamente isoladas mostraram evidências de que a taxa de Hb é um aspecto hereditário [12]; essa evidência suporta pesquisa anterior, feita duas vezes, em gêmeos australianos [13]. Além disso, dois grupos geneticamente isolados de italianos do sul da Itália tiveram Hb mais baixa do que um grupo geneticamente isolado do norte da Itália [12].

Ao derivar limites de referência para crianças, é desejável excluir deficiência subclínica de ferro. Mesmo em adultos, diferenças sutis nas reservas de ferro podem afetar médias populacionais. Por exemplo, a heterozigose de mutações associadas à hemocromatose genética é comum em populações do norte da Europa (cerca de 12%) e está associada com pequena, mas significativa, diferença da hemoglobina, que é de 0,4 a 0,6 g/dL mais alta entre portadores do que entre não portadores [14]. Discreta elevação de Hb, Hct, VCM, HCM e CHCM foi comprovada em pacientes com hemocromatose não tratada, provavelmente por maior oferta de ferro aos eritroblastos [15].

Uma vez dispondo de uma série de resultados de exames, estes deverão ser submetidos a técnicas estatísticas apropriadas para a distribuição de dados. Se os dados tiverem uma distribuição normal (gaussiana), será possível calcular a média e o desvio-padrão (DP), e a média \pm 1,96 DP representará os 95%

centrais da série de dados. Comumente usa-se a média \pm 2DP, o que inclui 95,4% dos dados. A Hb e os outros parâmetros eritrocitários podem ser tratados como se tivessem distribuição gaussiana, embora as distribuições não sejam exatamente gaussianas [16]. Outros parâmetros hematológicos têm distribuição assimétrica, com uma cauda no sentido dos valores mais altos; isso ocorre na contagem global e nas contagens absolutas dos vários tipos de leucócitos. Se dados com esse tipo de distribuição forem tratados como se fossem gaussianos, as estimativas dos limites superior e inferior serão erroneamente baixas, sendo o limite inferior frequentemente negativo. Uma transformação logarítmica pode ser suficiente, mas às vezes necessita-se de uma transformação mais complexa [17]. Se não puder haver uma transformação gaussiana pela transformação dos dados, deverá ser feita uma análise não paramétrica, isto é, uma análise que não parta de suposições sobre a distribuição. A vantagem de utilizar transformação para uma distribuição gaussiana é que, com ela, um número menor de amostras mostra-se suficiente (cerca de 36 amostras), em contrapartida ao número mínimo de 120 amostras exigido para uma análise não paramétrica [18].

O uso do intervalo central de 95% é arbitrário, mas proporciona um certo equilíbrio entre a falta de identificação de uma anormalidade clinicamente significativa e a classificação errônea de um indivíduo normal como anormal. Porém, ao comparar o valor observado no paciente com os limites de referência do laboratório – que muitos ainda denominam “valores normais” –, deve-se estar ciente de que, para cada exame, 5% dos resultados de indivíduos sadios ficarão fora do intervalo “normal” assim arbitrado. De maneira inversa, um indivíduo pode, em consequência de um processo mórbido, ter um resultado de exame diferente do seu resultado usual e ainda assim permanecer dentro da faixa “normal”. Sempre que se dispuser de resultados anteriores do paciente, deve-se atentar a estes, além de conferir se o resultado atual está fora dos valores de referência do laboratório.

Se o laboratório não calcular seus próprios limites de referência, mas adotar os de outros laboratórios, deve certificar-se não apenas de que partiu de uma população semelhante e de que foram aplicadas as técnicas estatísticas apropriadas, mas também de que as técnicas de coleta de sangue e os métodos laboratoriais, inclusive os de calibração dos instrumentos, sejam idênticos.

Os parâmetros hematológicos são afetados não apenas por idade, sexo, origem étnica e altitude,

TABELA 5.2 Alguns fatores demográficos que afetam os parâmetros hematológicos*

Sexo
E, Hb e Hct são mais altos em homens do que em mulheres
Mulheres em idade reprodutiva têm contagens de leucócitos e de neutrófilos mais altas do que os homens; após a menopausa, a contagem de leucócitos torna-se mais baixa do que a de homens
A contagem de plaquetas é mais alta em mulheres do que em homens
Idade
Valores normais de recém-nascidos, lactentes e crianças diferem amplamente dos encontrados em adultos (ver Tabelas 5.8 a 5.12)
Na maioria dos levantamentos, a Hb aumenta nas mulheres e diminui nos homens após a idade de 40 a 50 anos, e diminui na velhice tanto em homens como em mulheres
A contagem dos linfócitos diminui na velhice
Origem étnica
As contagens de leucócitos e de neutrófilos são mais baixas em negros do que em brancos, e mais baixas em africanos do que em afro-caribenhos e em afro-americanos (ver Tabela 5.7); também são mais baixas em judeus iemenitas do que nos demais brancos; a contagem de leucócitos mais baixa nos negros não se nota ao nascimento, mas a partir de 1 ano de idade;
a contagem absoluta de linfócitos em afro-americanos é discretamente mais elevada do que em americanos brancos [10];
a contagem de leucócitos e as contagens diferenciais de indianos e chineses e de populações do Sudeste Asiático são as mesmas dos brancos norte-europeus; a contagem de eosinófilos é a mesma em indivíduos sadios de diferentes grupos étnicos
Negros têm contagens de plaquetas mais baixas do que brancos
Afro-americanos, com exclusão de traço α -talassêmico e deficiência de ferro, têm Hb mais baixa, cerca de 0,34 g/dL em homens e 0,32 g/dL em mulheres, do que americanos brancos [10]
Localização geográfica
E, Hb e Hct aumentam com a altitude; em um estudo, em resposta à altitude moderada, aumentaram apenas os eritrócitos, com baixa do VCM, ao passo que, a uma grande altitude, também houve aumento de Hb e Hct [19]; em outro estudo dos efeitos agudos da variação de altitude, o aumento de E e Hb em 14 dias foi proporcionalmente menor do que o aumento do Hct [20]; nesse período, o VCM aumentou em média de 85 para 93 fL; a contagem de plaquetas aumenta significativamente com a altitude [20, 21]; bebês nascidos em altitudes elevadas têm contagem de leucócitos e de neutrófilos mais alta [22]
Estação do ano
Em conjunto, Hb e Hct são um pouco mais baixos no verão [23]; em não fumantes, são mais baixos no verão devido ao aumento do volume plasmático [24]; em fumantes, no verão a CHCM é mais baixa e E e Hct são mais altos; o volume plasmático não se altera [24]

*Para outras referências relevantes, ver a primeira edição deste livro [1].

mas também por outros fatores biológicos e influências ambientais (Tabelas 5.2 e 5.3).

Os efeitos da idade são complexos e resultados consistentes não têm sido sempre obtidos. A diferença de sexo na Hb e parâmetros eritroides correlatos diminui após a menopausa, mas, independentemente da taxa de ferritina e da saturação de transferrina séricas, a Hb persiste 1 g/dL inferior em mulheres [33]. A Hb em homens diminui cerca de 1 g/dL entre a juventude e a velhice, especialmente após os 60 anos, enquanto em mulheres a Hb persiste estável [33]. Em estudo longitudinal da população na Suécia, a Hb aumentou em mulheres e diminuiu em homens de 40 a 50 e 70 a 80 anos [34]. Em extenso estudo populacional fracionado feito na França, a Hb mostrou-se mais alta em mulheres de mais de 50 anos, provavelmente devido à menor prevalência de carência de ferro, já que houve elevação, também, do VCM e da HCM [35]. Homens sadios

mostraram diminuição média da Hb de 15,2 para 14,1 g/dL entre os 70 e 88 anos ($p < 0,05$), ao passo que em mulheres sadias não houve alteração significativa (valores médios de 14,0 e 13,8 g/dL, $p > 0,05$), de modo que, após os 85 anos, não houve mais diferença entre os sexos. Limites inferiores para Hb foram previamente definidos como 13,3 g/dL para homens idosos saudáveis e 12,0 g/dL para mulheres idosas saudáveis [35]. Em um estudo italiano, a Hb mostrou-se significativamente mais alta em mulheres pós-menopausa do que em mulheres pré-menopausa, ao passo que homens acima de 60 anos mostraram Hb média significativamente mais baixa do que homens mais jovens [12]. Nos Estados Unidos, resultados para homens foram similares, mas um declínio na Hb foi notado em mulheres a partir dos 50 anos [13]. Acima dos 80 anos, a Hb média é mais baixa em ambos os sexos, mas é impossível excluir a influência de doenças ocultas [12]. Em um

TABELA 5.3 Alguns fatores biológicos e influências externas comuns que afetam os parâmetros hematológicos*

<p>Variação diurna</p> <p>Hb e Hct são mais altos pela manhã do que ao anoitecer</p> <p>As contagens de leucócitos e de neutrófilos são mais altas à tarde do que pela manhã; a contagem de eosinófilos é mais baixa das 10 horas ao meio-dia, aumentando até duas vezes entre a meia-noite e as 4 horas da madrugada; a contagem de linfócitos é mais baixa pela manhã e mais alta ao anoitecer [25]</p> <p>A contagem de plaquetas é mais alta durante a tarde e o início da noite</p> <p>Gravidez (ver Tabela 5.14)</p> <p>E, Hb e Hct diminuem; o VCM aumenta cerca de 6 fL em média</p> <p>As contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos aumentam durante a gravidez; ocorre desvio à esquerda; as contagens de linfócitos, eosinófilos e basófilos diminuem</p> <p>O escore da fosfatase alcalina dos neutrófilos aumenta</p> <p>Tem sido observada baixa da contagem de plaquetas durante a gravidez, mas quando se excluem as gestantes com hipertensão associada à gravidez, geralmente não há baixa</p> <p>A velocidade de sedimentação globular aumenta</p> <p>Trabalho de parto</p> <p>Durante o trabalho de parto, ocorre um novo e acentuado aumento da contagem de leucócitos e de neutrófilos, associado a uma queda acentuada da contagem de eosinófilos e a uma ligeira queda adicional da contagem de linfócitos</p> <p>Pós-parto</p> <p>E, Hb e Hct atingem seu nadir 3-4 dias após o parto</p> <p>As contagens de leucócitos e de neutrófilos permanecem acentuadamente elevadas durante alguns dias após o parto; caem gradualmente no decorrer de 4-6 semanas</p> <p>Menstruação</p> <p>As contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos diminuem durante a menstruação; verifica-se uma alteração recíproca na contagem de eosinófilos; a contagem de basófilos diminui no meio do ciclo</p> <p>Menopausa</p> <p>A Hb aumenta após a menopausa</p> <p>As contagens de leucócitos e de neutrófilos diminuem</p> <p>Exercícios</p> <p>A contagem global e a contagem absoluta de todos os tipos de leucócitos aumentam como resposta a exercício vigoroso; o aumento dos neutrófilos é menor em negros do que em brancos [26]; o choro intenso, em bebês, causa aumento da contagem de leucócitos; em bebês recém-circuncidados, acompanha-se de desvio à esquerda [4]</p> <p>E, Hb e Hct aumentam em resposta a exercício vigoroso</p> <p>Treinamento intensivo causa baixa do número de linfócitos [27]</p> <p>Tabagismo [28]</p> <p>E, Hb, Hct, VCM e HCM são mais altos em fumantes</p> <p>As contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos são mais altas</p> <p>A contagem de plaquetas é mais alta</p> <p>A velocidade de sedimentação globular é mais alta</p> <p>Ingestão de álcool</p> <p>O consumo de álcool pode estar associado a aumento da Hb [29], mas um consumo intenso pode causar anemia, leucopenia e trombocitopenia</p> <p>VCM e HCM são mais altos e a contagem de eritrócitos é mais baixa</p> <p>Obesidade</p> <p>A contagem de leucócitos correlaciona-se com a gordura corporal [30] e aumenta na obesidade mórbida [31]</p> <p>A contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e eritrócitos aumentam com a obesidade; VCM e HCM diminuem [32]</p>

*Para outras referências relevantes, ver a primeira edição deste livro [1].

estudo japonês, homens mostraram declínio da Hb a partir da quarta década, enquanto mulheres mostraram um pico na sexta e na sétima décadas e um declínio apenas daí em diante [37]. Esse declínio com a

idade foi notado na ausência de qualquer sinal aparente de doença relacionada à anemia [37].

Há necessidade de valores de referência obtidos a partir de dados locais em populações que vivem

em altitudes elevadas. Acima de 2.000 m, a Hb é cerca de 1,0-1,5 g/dL mais alta; a contagem de eritrócitos e o hematócrito também aumentam [19]. Cidades que exigem valores de referência locais, pela elevada altitude, incluem Cidade do México e Puebla (México), La Paz (Bolívia), Quito (Equador), Bogotá (Colômbia), Joanesburgo (África do Sul) Teerã (Irã); nos Estados Unidos, Santa Fé, Denver, Albuquerque, Reno, Salt Lake City, El Paso e Billings [38].

Valores de referência para adultos

Alguns valores de referência para parâmetros eritroides em adultos brancos são mostrados na Tabela 5.4, e alguns dados para adultos negros, na Tabela 5.5. Também estão incluídos dados obtidos a partir de mais de 30 mil indivíduos franceses, na maioria brancos, mas nesse levantamento não foram excluídas deficiência de ferro e hemoglobinopatias [35]. Valores de referência para brancos são apropriados para indianos, chineses e populações do Sudeste Asiático. Está descrito que groenlandeses nativos têm Hb mais baixa do que dinamarqueses,

TABELA 5.5 Hemoglobina e VCM em afro-americanos, nos quais foram excluídos deficiência de ferro e traço α -talassêmico [10]; são mostrados média e intervalo de referência (95%)*

	Homens (n = 172)	Mulheres (n = 42)
Hb (g/dL)	12,7-16,7	11,3-14,9
VCM (fL)	80-99	81,5-99

*A Hb foi significativamente mais baixa do que em brancos, o VCM foi similar. O traço falciforme não teve influência nem na Hb nem no VCM.

diferença esta não explicada por dieta, fumo ou prevalência de falta de ferro [29].

Parâmetros relativos ao leucograma, em brancos adultos, são mostrados na Tabela 5.6. Quanto a contagens de leucócitos, particularmente a de neutrófilos, são necessários limites específicos para africanos e para afro-caribenhos (Tabela 5.7). As contagens mais baixas de leucócitos e de neutrófilos observadas nesses grupos étnicos podem depender em parte da dieta e de outras influências ambientais, mas existe uma verdadeira diferença biológica

TABELA 5.4 Limites de referência (95%) para os parâmetros eritrocitários em adultos brancos em cinco séries grandes de indivíduos

	Homens					Mulheres				
E ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,32-5,66*				4,5-5,6†	3,88-4,99*				3,9-5,1†
Hb (g/dL)‡	13,3-16,7*	13,3-17,6§	13,2-18,0¶	13,2-16,9**	13,7-17,2†	11,8-14,8*	12,0-15,8§	12,2-15,0¶	11,5-15,4**	12,0-15,2†
Hct (%)	39-50*		39-51¶		40-50†	36-44*		36-48¶		37-46†
VCM (fL)	82-98††			82-99**	83-98†	82-98††			81-99**	85-98†
HCM (pg)	27,3-32,6				28,0-32,0†	27,3-32,6				28,0-32,0†
CHCM (% ou g/dL)	31,6-34,9				32,0-36,0†	31,6-34,9				32,0-36,0†
RDW (%)	9,9-15,5††					9,9-15,5††				
	11,6-13,9††				11,6-14,1 (%)‡	11,6-13,9††				12-14,7 (%)‡
HDW (g/dL)	1,82-2,64††					1,82-2,64††				

*Com base em 700 indivíduos saudáveis, de 18 a 60 anos de idade, estudados pela autora (350 homens e 350 mulheres). Metade dos exames foi feita em instrumentos Coulter (S e S Plus IV) e a outra metade, em instrumentos Bayer-Technicon (Hemalog 8 e H.2). Exceto quando indicado, os dados derivam de todos os 700 indivíduos.

†Sysmex XE-2100, 159 homens, 91 mulheres, idades 30-65 anos [39].

‡2,5 centes = 13,4 g/dL para homens de idade 20 a 59 anos (n = 6.709), 12,8 g/dL para homens de idade de 60 anos ou mais (n = 5.615), 11,9 g/dL para mulheres (n = 11.286) [40].

§Com base em 1.379 homens dinamarqueses e 1.003 mulheres dinamarquesas, todos com boas reservas de ferro [29].

¶Com base em 1.382 homens e 1.837 mulheres para Hb e 1.368 homens e 1.818 mulheres para Hct [41].

**Com base em 6.240 homens e 5.780 mulheres após exame de saúde; deficiência de ferro foi excluída [10]; o VCM é muito dependente da tecnologia e da calibração dos instrumentos, de modo que é importante a derivação de valores de referência próprios a cada laboratório.

††Coulter S Plus IV, n = 200.

‡‡Bayer H.2, n = 200.

TABELA 5.6 Limites de referência (95%) para contagens manuais e automatizadas de leucócitos, derivados pela autora de dados de 700 indivíduos brancos saudáveis, de 18 a 60 anos de idade

	Homens	Mulheres	Método e número (n) de indivíduos
Leucócitos × 10 ³ /μL	3,7-9,5	3,9-11,1	Vários métodos, n = 750
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,7-6,1	1,7-7,5	Bayer-Technicon H.2, n = 200 (contagens automatizadas)
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,0-3,2		
Monócitos × 10 ³ /μL	0,2-0,6		
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,03-0,46		
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,09		
LUC* / × 10 ³ /μL	0,09-0,29		
Granulócitos × 10 ³ /μL	1,8-7,5	2,1-8,9	Coulter S Plus IV, n = 200 (contagens automatizadas)
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,15-3,25		
Células mononucleares × 10 ³ /μL	0,18-0,86		
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-6,5	1,8-7,4	Contagem Coulter S ou S IV; fórmula manual 500 células, n = 400
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,1-3,5		
Monócitos × 10 ³ /μL	0,21-0,92		
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,67		
Basófilos × 10 ³ /μL	0-0,13		

*LUCs, células grandes não coradas (peroxidase-negativas).

TABELA 5.7 Limites de referência (95%) para contagens de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em adultos africanos, afro-caribenhos e negros norte-americanos

Origem étnica	Homens leucócitos	Mulheres leucócitos	Homens neutrófilos	Mulheres neutrófilos	Comentários
Africanos	2,8-7,2	3,0-7,4	0,9-4,2	1,3-3,7	n = 57 H, 29 M*
Afro-caribenhos	3,1-9,4	3,2-10,6	1,2-5,6	1,3-7,1	n = 38 H, 39 M*
Ugandenses (Kampala)	1,9-8,3	–	0,32-3,6	–	n = 250 [42]
Ugandenses (Makerere)	2,2-8,9	–	0,55-3,7	–	n = 160 [42]
Ugandenses†	3,4-8,7		0,84-3,37		n = 845, HIV-negativos [43]
Ugandenses (Kampala)	2,8-8,2	3,2-9,0	0,9-3,8	1,1-4,4	n = 520 H, 140 M, HIV e hepatites B e C negativos [44]
Tanzanianos	3,2-8,0	3,0-7,9	1,1-4,8	1,2-5,4	n = 150 H, 126 M, HIV-negativos [45]
Etiopes‡	3,0-9,8	3,0-12,2	1,05-7,2	0,75-5,5	n = 280 H, 205 M, HIV-negativos [46]
Gambianos	3,3-8,2	3,5-8,4	–	–	Limites 90%, HIV-negativos [47]
Ruandenses, quenianos, ugandenses, zambianos	3,1-9,1		1,0-5,3		n = 1.083 H, 1.022 M, HIV e hepatites B e C negativos [48]
Quenianos	2,5-7,4	3,3-9,7	0,8-3,9	1,3-3,8	n = 77 H, 83 M, HIV-negativos [49]
Nigerianos	*3,0-10,0		2,4-7,2		n = 49, idade 14-17 anos [50]
Afro-americanos	3,6-10,2	1,3-7,4	–	–	n = 65 [51]
Afro-americanos	3,5-9,6	3,4-11,2	1,1-6,7	1,5-8,1	n = 172 H, 525 M [52]
Afro-americanos	3,2-10,2¶	–	1,1-6,8¶	–	n = 493 [53]
Afro-americanos, idade 12 a 18 anos	3,2-9,3		1,0-6,2		n = 401 [54]
Afro-americanos, idade > 18 anos	3,1-9,9		1,3-6,6		

H, homens; M, mulheres.

*Derivados pela autora.

†Contagem de linfócitos foi 1,4-4,2.

‡Contagem de linfócitos foi 1,0-3,5 em homens e 1,1-3,5 em mulheres.

§Contagem de linfócitos 1,0-3,5 em homens e 1,3-3,8 em mulheres; a diferença das contagens de leucócitos e neutrófilos entre os sexos foi estatisticamente significativa.

¶Dados obtidos do gráfico.

[26, 27, 55]. Neutropenia étnica em indivíduos de origem africana está associada com um fenótipo Duffy-nulo pela presença de uma variante do receptor para quimioquinas do antígeno Duffy [56]. A contagem mais baixa de leucócitos e neutrófilos decorre de uma diferença de produção de neutrófilos na medula óssea [55] e não de uma diferença periférica na marginação; a resposta ao breve exercício [26], ao exercício continuado [27] e à administração de fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) é menor do que em brancos, embora a resposta absoluta a corticoides seja idêntica [57]. A contagem de monócitos também é algo inferior em indivíduos de origem africana do que em brancos [53]. Já a contagem mais alta de eosinófilos, anteriormente descrita em africanos e indianos, não representa diferença biológica em relação a brancos: deve-se à presença de doença subclínica, especialmente parasitoses. Há referência a contagens mais altas de neutrófilos e monócitos em americanos de origem mexicana do que em americanos brancos [58] e em americanos latinos do que em americanos brancos, negros e asiáticos [52]. Em virtude da maior precisão, limites de referência para fórmulas leucocitárias automatizadas são mais estreitos do que limites para fórmulas manuais (ver Tabela 5.6). Eles também dependem da metodologia e, portanto, têm de ser derivados especificamente para os

modelos individuais de instrumentos. Nem mesmo instrumentos que operam com base nos mesmos princípios proporcionam resultados idênticos.

Limites de referência para recém-nascidos e fetos

As Tabelas 5.8 e 5.9 mostram alguns valores de referência de parâmetros hematológicos em recém-nascidos. Contagens mais altas de leucócitos e neutrófilos são vistas em bebês do sexo feminino [70, 75]. Limites publicados para parâmetros eritroides em bebês indianos [76] e jamaicanos, com exclusão de β -talassemia e hemoglobinopatias [65], são similares ao de neonatos europeus; bebês nigerianos, entretanto, mostraram valores mais baixos para eritrócitos, Hb e Hct [66]. Como neste último grupo não foram excluídas β -talassemia e hemoglobinopatias, parece apropriado aplicar limites de referência de indivíduos brancos para todos os grupos étnicos, inclusive africanos. A contagem de neutrófilos mais baixa dos africanos e afro-caribenhos não é notada no período neonatal: aparece mais tarde, de modo que podem ser aplicados os mesmos limites de referência para contagens leucocitárias de neonatos em todos os grupos étnicos [69-71, 77]. A contagem neonatal de linfócitos é de considerável

TABELA 5.8 Limites de referência (95%) para parâmetros eritrocitários em recém-nascidos a termo, durante o primeiro mês de vida

	E ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)
Branco				
Sangue do cordão (clameamento precoce) [59]	3,5-6,7	13,7-20,1	47-59	90-118
Sangue do cordão (tempo de clameamento não especificado)* [60]	3,13-4,85	11,3-17,6		99-115
Nascimento – 96 horas				
(clameamento precoce) [61, 62]	3,8-6,5	14,2-24,0	46-75	101-137
(clameamento tardio) [62]		16,1-24,0		
"recém-nascido" [63]	4,1-6,7	15,0-24,0	44-70	102-115
1-2 semanas (clameamento precoce) [61]	3,2-6,4	12,8-21,8	38-70	75-149
3-4 semanas (clameamento precoce) [61, 64]	2,8-5,3	10,1-18,3	32-55	90-120
Jamaicanos				
1 dia [65]	4,6-7,6	15,7-27,5		90-118
1 semana [65]	4,0-6,9	13,4-22,4		88-116
4 semanas [65]	3,1-5,9	9,5-18,1		83-107
Nigerianos				
1 dia [65]	2,7-5,3	11,6-19,6	32-58	113 (média)
2 semanas [66]	2,35-4,55	9,4-16,8	31-47	113 (média)
4 semanas [66]	2,1-3,95	7,5-13,6	24-41	108 (média)
1-7 dias [50]		13,5-18,0	40-53	
8-14 dias [50]		13,0-16,0	38-51	

*Brasileiros de Porto Alegre; portanto, essencialmente brancos.

TABELA 5.9 Limites de referência (90 ou 95%) para contagens de leucócitos e de eritroblastos em bebês caucasoides a termo, durante o primeiro mês de vida*

Idade	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eritroblastos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Sangue do cordão [59, 60, 67, 71]	5,0-23	1,7-19,0	1,0-11	0,1-3,7	0,05-2,0	0,03-5,4
30 minutos [69, 72]		1,9-5,8				
12 horas [39, 67, 69]		6,6-23,5				
24 horas [67, 69]		4,8-17,1				
"Recém-nascido" [63]	9,1-34,0	6,0-23,5	2,5-10,0	< 3,5	< 2,0	< 0,4
48 horas [67, 69]		3,8-13,4				
0 a 60 horas [68]			2,0-7,3	0-1,9	0-0,8	
72 horas [67, 69]		2,0-9,4				
4 dias [67, 69, 72]		1,3-8,0	2,2-7,1	0,2-1,8	0,2-1,9	
60 horas a 5 dias [68, 69]		2,0-6,0	1,9-6,6	0-1,7	0-0,8	
7 a 8 dias [67, 69, 73]	9,0-18,4	1,8-8,0	3,0-9,0	0,03-0,98	0,16-0,94	0,03-0,11
2 semanas [67, 69]		1,7-6,0				
5 dias 4 semanas [68, 69]		1,8-5,4	2,8-9,1	0,09-1,7	0-0,8	
3 a 4 semanas [68, 69]		1,6-5,8				
4 semanas [74]	5,0-19,5	1,0-9,0	4,0-13,5			

*Dados de diversas séries foram reunidos para incluir os limites mais baixos e mais altos encontrados. Os limites de Gregory e Hey [67] e Weinberg e colaboradores. [68] são 90% em vez de 95%, enquanto os *scatter plots* de Manroe e colaboradores. [69] mostram a completa extensão dos resultados. Note-se que Schmutz e colaboradores. [70], em estudo feito em altitude próxima a 1.500 m, encontraram padrão similar de variação na contagem de leucócitos e neutrófilos com o tempo, mas as contagens absolutas foram muito mais altas do que as notadas por Manroe e colaboradores. [69].

importância pois pode sugerir a possibilidade de imunodeficiência congênita. Na imunodeficiência combinada severa a contagem é invariavelmente inferior a $2,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ e admite-se que a investigação pertinente é mandatória se a contagem de linfócitos for $< 1 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Hb, Hct e E do recém-nascido são consideravelmente influenciados pelo momento no qual é clampeado o cordão umbilical (ver Tabela 5.8), uma vez que o aporte do sangue placentário aumenta a volemia do recém-nascido em até 50 a 60% durante os primeiros minutos após o nascimento. A velocidade de transferência do sangue placentário para o recém-nascido aumenta quando se administra ocitocina à mãe, para estimular as contrações uterinas, e diminui quando o bebê é erguido acima do nível da mãe, logo após o parto. Durante as primeiras horas de vida, o volume plasmático diminui e, como consequência, Hb, Hct e E aumentam apreciavelmente, sobretudo quando o clameamento foi tardio. Um número apreciável de eritroblastos pode estar presente ao nascimento, mas diminui rapidamente nas primeiras 24 horas; por volta do quarto dia, são raros. Eritroblastos são mais numerosos no sangue do cordão de prematuros e de recém-nascidos de mães diabéticas [78] e também quando houve perda sanguínea fetal, hemólise e hipoxia intrauterina. A contagem de reticulócitos é mais

alta ao nascimento do que em qualquer outro momento da vida, porém, diminui acentuadamente após o nascimento. Verifica-se um declínio rápido e progressivo de E, Hb e Hct, mas, como se vê na Tabela 5.8, uma hemoglobina inferior a 14 g/dL na primeira semana de vida é indicativa de anemia. A contagem de leucócitos, ao nascimento, é influenciada pelo tipo de parto, sendo mais baixa após cesárea eletiva do que após parto vaginal, ou quando a cesárea foi realizada depois de iniciado o trabalho de parto [70, 79]. Após o nascimento, as contagens de leucócitos e de neutrófilos aumentam até um pico em torno da décima segunda hora; a partir de então, diminuem abruptamente [69, 70]. A contagem de linfócitos diminui nos primeiros dias de vida [72]. A contagem de neutrófilos é, inicialmente, mais alta do que a de linfócitos; a situação inverte-se entre o quarto e o sétimo dias de vida.

O tabagismo materno causa pequeno aumento na Hb, no Hct e no VCM neonatais, além de uma queda mais substancial na contagem de neutrófilos, a qual persiste por alguns dias após o nascimento [80]. Bebês saudáveis, mas pequenos para a idade gestacional, diferem de bebês de peso normal: E, Hb, Hct e VCM são mais altos, ao passo que HCM e CHCM são mais baixas; eritroblastos e precursores granulocíticos são mais numerosos; contagens de plaquetas e neutrófilos podem ser mais baixas

[81, 82]. Outras causas de fatores maternos e fetais influenciando a contagem de neutrófilos no recém-nascido são vistas nas Tabelas 6.5 e 6.23, e causas de poliglobulia e de anemia no período neonatal, nas Tabelas 6.2 e 6.20. Aumento de eritroblastos no primeiro dia de vida parece ter valor preditivo de hemorragia intraventricular em neonatos prematuros [83].

Também foram publicados limites aplicáveis ao feto a partir da oitava semana de gestação, e uma representação gráfica é vista na Figura 5.1 [84-87]. Em outro trabalho, em fetos tailandeses entre 18 e 22 semanas de gestação, com exclusão de mutações α -talassêmicas, os limites 95% foram: Hb 9,68-13,0 g/dL, VCM 107-138 fL, HCM 34,7-48,1 pg e CHCM 30,8-36,0 g/dL [88]. A contagem de plaquetas média no feto é de $250 \times 10^3/\mu\text{L}$ e não se altera entre a 17ª semana e o termo [89]; nesse trabalho com 5.194 fetos, os limites de referência (95%) foram $138\text{-}344 \times 10^3/\mu\text{L}$, mas fetos com anormalidades significativas, causando trombocitopenia, não foram excluídos da análise. Uma contagem inesperadamente elevada de eosinófilos às vezes se observa em fetos saudáveis [90].

Bebês prematuros têm contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos mais baixas do que bebês a termo; eritroblastos e células mieloides imaturas são mais numerosos, e a contagem de reticulócitos é mais alta [72, 91]. Ao nascimento, Hb e Hct são semelhantes aos observados em bebês a termo, mas a contagem de eritrócitos é mais baixa e o VCM, mais alto [92]. Ao fim da primeira semana, as contagens de neutrófilos e de linfócitos atingem os níveis dos bebês a termo [72, 91]. Em bebês prematuros, a contagem de eosinófilos frequentemente eleva-se 2 a 3 semanas após o nascimento.

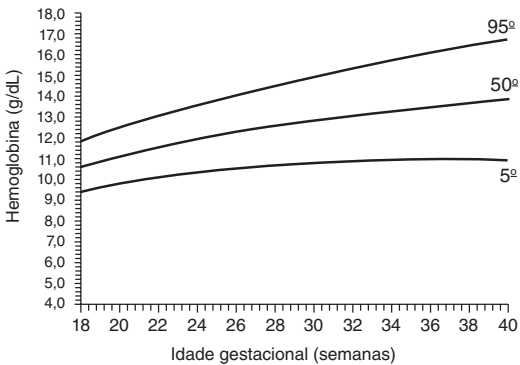


FIGURA 5.1 Dosagem de hemoglobina em 265 fetos saudáveis e limites de referência derivados dos dados, modificados a partir de Mari e colaboradores. [87].

Valores de referência em lactentes e crianças maiores

As Tabelas 5.10 e 5.11 mostram valores de referência aplicáveis a lactentes e crianças maiores brancas, e valores para crianças e adolescentes afro-americanos estão na Tabela 5.12. Após um pico inicial, há declínio de E, Hb e Hct até atingir um nadir, em torno dos 2 meses de idade. Ocorre queda rápida, simultânea, do VCM e da HCM. Nos bebês prematuros, o declínio pós-natal da Hb é mais rápido, prosseguindo por 8 a 12 semanas, em vez de 4 a 8 semanas; o nadir é mais baixo (Tabela 5.13). Em populações nas quais a deficiência de ferro é incomum, clameamento precoce do cordão não se associa com baixa da Hb e do VCM aos 4 meses de idade, embora a ferritina sérica e a saturação da transferrina sejam inferiores às de bebês que tiveram clameamento tardio [110].

Ao determinar limites de referência pediátricos, é importante excluir deficiência de ferro, pois um dos objetivos desses parâmetros é facilitar o diagnóstico de deficiência de ferro. Os estoques de ferro do recém-nascido são adequados para manter a eritropoese durante 3 a 5 meses, dependendo do bebê ter nascido a termo ou prematuramente, assim como de o clameamento do cordão ter sido precoce ou tardio. Daí em diante, a deficiência de ferro é comum. Para que a deficiência de ferro seja excluída, é necessário confirmar que haja valores normais de ferritina sérica, saturação da transferrina ou concentração de protoporfirina eritrocitária, ou que se administre suplemento de ferro antes do exame. Levantamentos na população seguidamente mostram um limite inferior de normalidade abaixo dos limites publicados nos livros-texto. Por exemplo, Edmond e colaboradores fizeram um levantamento em 1.075 lactentes em Bristol, dentre os quais apenas 1,2% tinha ferritina abaixo de 12 mg/L, e encontrou-se o 5º percentil para hemoglobina de apenas 9,7 g/dL [66]. Em outro trabalho no Reino Unido, em que não foi excluída a deficiência de ferro, 83 lactentes de 9 meses tinham Hb média de 9,8 g/dL, com limites (95%) de aproximadamente 7,2 a 12,3 g/dL [100].

A partir da puberdade, meninas têm contagem de neutrófilos mais alta do que meninos [103]. As contagens mais baixas de leucócitos e de neutrófilos, observadas em adultos negros, já estão descritas em crianças entre 1 e 5 anos [111] e em lactentes entre 9 e 12 meses de idade [112]. Limites de referência publicados para crianças da Melanésia mostram Hb e VCM inferiores aos de crianças brancas, mesmo tendo sido excluídos os traços α e β -talassêmicos e a deficiência de ferro sendo incomum [113]; isso talvez reflita a alta prevalência de má nutrição e malária na população estudada.

TABELA 5.10 Limites de referência 95% (ou 90%) para parâmetros eritrocitários em lactentes e crianças maiores* brancas; em um trabalho, também é mostrada a diferença de acordo com a dieta do lactente

	E (x 10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	HCM (pg)
2 meses [64, 69, 95]	2,6-4,3	8,9-13,2	26-40	75-125 [†] [69] 84-106 [†] [64]	
	2,95-4,09 [95]	9,1-12,5 [95]	27-38 [95]	84,7-98,1 [95]	28,6-33,1 [95]
3 meses [69, 97]	3,1-4,3	9,3-13,8	27-39	73-103	
4 meses [36]	3,5-5,1	10,3-14,1	32-44	76-97	
5 meses [95]	3,79-4,87	10,1-12,9	30-38	73,3-84,1	24,5-28,7
6 meses [64, 97]	3,9-5,5	9,9-14,1	31-41	68-85	
8 meses [98]		9,7-13,6 [§]			
1 ano [64, 97]	4,1-5,3	9,8-14,1	33-41	71-84	
1 ano [99]		10,0-13,4 [§]			
13 meses [95]	3,92-5,1	10,5-13,3	31-39	72,8-83,6	24,3-28,7
18 meses [97]		9,7-15,1			
18 meses [99]		10,2-13,0 [§]			
18 meses [100]		9,1-14,7 (leite de vaca) 9,8-14,7 (fórmula não enriquecida) 9,1-14,7 (fórmula enriquecida com ferro)			
1-23 meses [63]	3,8-5,4	10,5-14,0	32-42	72-88	
1-2 anos [94]		10,7-13,3			
1-4 anos[¶] [101]	3,5-5,3	10,7-15,1	31-45	72-100	23,8-34,2
3-5 anos [94]		10,9-13,7			
2-5/6 anos [64, 74, 93]	4,23-5,03	9,6-14,8	34-40	73-86	
2-9 anos [63]	4,0-5,3	11,5-14,5	30-43	76-90	
5-8 anos[¶] [101]	3,45-5,49	10,3-15,1	31-44	71-99	24,6-33,4
5/6-9 anos [74, 102, 103]	3,93-5,11	10,7-14,6	33-42	75-89,5	
6-11 anos [94]		11,5-14,5			
8-12 anos [104]	4,34-5,74	12,1-14,5	36,6-45,2	76,5-92,1	
9-12 anos [74, 102, 103]	4,08-5,11	11,5-15,4	34-42	76-91	
9-12 anos[¶] [101]	4,11-5,49	11,3-15,3	34-44	72-99,6	24-34
12-14/15 anos [74, 93, 94, 103]					
Sexo masculino	4,19-5,54	11,5-15,8	36-46	76-92	
Sexo feminino	4,0-5,09	11,5-15,3	35-44	77-92,5	
13-14/18 anos [74, 102, 103, 104]					
Sexo masculino	4,34-5,88	12,7-17	37-49	77-95,6	
Sexo feminino	3,9-5,42	11,3-15,4	35-46	75-93,8	

*Alguns dados foram fundidos para incluir os limites máximos e mínimos das diversas séries. Deficiência de ferro foi excluída na maioria das séries [64, 74, 93-95]. Outras referiram que a Hb é raramente inferior a 11 g/dL em crianças que não tenham falta de ferro [96]; os dados de Castriota-Scanderberg e colaboradores. [93] e os primeiros de Dallman e Siimes [74] suportam essa afirmação. Em investigações mais recentes, a Hb esteve algumas vezes abaixo de 11 g/dL em crianças com menos de 5 anos de idade [94].

[†]VCM calculado por micro-hematócrito/contagem de eritrócitos [69].

[‡]VCM medido em contador de impedância [64].

[§]Limites de 90% em vez de 95%, incidência muito baixa de falta de ferro, hemoglobina medida por HemoCue em amostras de picada do calcanhar; meninas aos 18 meses mostraram hemoglobina significativamente mais alta do que meninos, mas a diferença foi mínima (0,141 g/dL).

[¶]América Central, altitude 0-750 m, Hb por hemoglobinometria, micro-hematócrito e contagem de eritrócitos no Coulter Modelo B [101].

TABELA 5.11 Limites de referência (95%) para contagens global e diferencial de leucócitos, em lactentes, crianças maiores e adolescentes, todos brancos

Idade	9 dias a 1 ano*	2 meses†	5 meses†	1 ano*	1 ano‡	13 meses‡
Leucócitos × 10 ³ /μL	7,3-16,6	5,1-15,4	5,9-16,6	5,6-17,0	6,0-17,5	5,9-16,1
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-6,9	0,7-4,7	1,1-5,6	1,5-6,9	1,5-8,5	1,0-7,6
Linfócitos × 10 ³ /μL	3,4-9,4	3,0-9,9	3,2-10,6	2,5-8,6	4,0-10,5	3,1-9,6
(linfócitos + LUCs)		(3,3-10,5)	(3,4-11,3)			(3,5-10,4)
Monócitos × 10 ³ /μL	0,21-1,64	0,36-1,2	0,25-1,2	0,15-1,28		0,25-0,91
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,06-0,62	0,09-0,84	0,1-1,0	0,06-0,62		0,05-0,88
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,17	0,02-0,13	0,02-0,18	0,02-0,12		0,02-0,13
LUCs × 10 ³ /μL	0,09-0,61	0,17-0,91	0,17-1,0	0,13-0,72		0,20-1,1
Idade	2 anos*	2 anos‡	3 anos*	4 anos*	4 anos‡	5 anos*
Leucócitos × 10 ³ /μL	5,6-17,0	6,0-17,0	4,9-12,9	4,9-12,9	5,5-15,5	4,9-12,9
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-6,9	1,5-8,5	1,5-6,9	1,8-7,7	1,5-8,5	1,8-7,7
Linfócitos × 10 ³ /μL	2,2-7,7	3,0-9,5	1,7-5,5	1,7-5,5	2,0-8,0	1,6-4,3
Monócitos × 10 ³ /μL	0,15-1,28		0,15-1,28	0,15-1,28		0,15-1,28
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,04-1,19		0,04-1,19	0,9-1,4		0,9-1,4
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,12		0,02-0,12	0,03-0,12		0,03-0,12
LUCs × 10 ³ /μL	0,11-0,68		0,09-0,48	0,09-0,38		0,08-0,32
Idade	6 anos*	6 anos‡	4-6 anos§	4-7 anos¶	7 anos*	7-8 anos§
Leucócitos × 10 ³ /μL	4,4-10,6	5,0-14,5	4,8-12,1	6,3-16,2	4,4-10,6	4,5-11,7
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-5,9	1,5-8,9	1,7-7,6	1,6-9,0	1,5-5,9	1,7-7,4
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,6-4,3	1,5-7,0	1,6-4,2	2,2-9,8	1,6-4,3	1,7-4,3
Monócitos × 10 ³ /μL	0,15-1,28		0,33-1,16	0,06-1,0	0,15-1,28	0,32-1,21
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,08-1,1		0,06-0,95	0-1,4	0,08-1,01	0,08-1,0
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,12		0-0,73	0-0,026	0,02-0,12	0,02-0,51
LUCs × 10 ³ /μL	0,07-0,26				0,07-0,26	
Idade	8 anos*	8 anos‡	9-10 anos*	9-10 anos§	10 anos‡	
Leucócitos × 10 ³ /μL	3,9-9,9	4,5-13,5	3,9-9,9	4,4-10,6	4,5-13,5	
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-5,9	1,5-8,0	1,5-5,9	1,7-6,4	1,8-8,0	
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,4-3,8	1,5-6,8	1,4-3,8	1,7-3,9	1,5-6,5	
Monócitos × 10 ³ /μL	0,15-1,28		0,15-1,28	0,33-0,99		
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,08-1,01		0,08-1,01	0,06-1,03		
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,12		0,02-0,12	0,01-0,54		
LUCs × 10 ³ /μL	0,07-0,26		0,07-0,26			
Idade	11 anos*	11-12 anos§	12-13 anos*	13-14 anos§	14 anos*	15-16 anos*
Leucócitos × 10 ³ /μL	3,9-9,9	4,0-10,4	3,9-9,9	4,2-10,7	3,9-9,9	3,9-9,9
Neutrófilos × 10 ³ /μL	1,5-5,9	1,6-6,2	1,5-5,9	1,7-7,2	1,4-5,6	1,7-5,7
Linfócitos × 10 ³ /μL	1,4-3,8	1,5-3,7	1,4-3,8	1,4-3,6	1,4-3,8	1,4-3,8
Monócitos × 10 ³ /μL	0,15-1,28	0,31-1,0	0,15-1,28	0,26-1,0	0,15-1,28	0,15-1,28
Eosinófilos × 10 ³ /μL	0,04-0,76	0,06-1,12	0,04-0,76	0,05-0,61	0,04-0,76	0,04-0,76
Basófilos × 10 ³ /μL	0,02-0,12	0,01-0,38	0,02-0,1	0,01-0,43	0,07-0,10	0,02-0,10
LUCs × 10 ³ /μL	0,07-0,26		0,02-0,1		0,07-0,26	0,07-0,26

*Contagens diferenciais feitas no Hemalog D [73]; LUCs (células grandes não coradas) são células, peroxidase-negativas que, em crianças saudas, geralmente são linfócitos grandes.

†Contagens diferenciais feitas no analisador Bayer H.1 [105]; LUCs são células, peroxidase-negativas que, em crianças saudas, geralmente são linfócitos grandes.

‡Contagem diferencial manual em 100 células [106].

§Contagem diferencial feita no Coulter STKS; os números para crianças de ambos os sexos foram fundidos [103].

¶Contagem diferencial manual em 200 células, recalculada para permitir a expressão de distribuição não gaussiana [107, 108].

TABELA 5.12 Limites 95% (e média) derivados de 5.039 crianças e adolescentes afro-americanos, com exclusão de deficiência de ferro, β -talassemia e “suspeita de traço α -talassêmico” [11]

Idade (anos) e sexo	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)
2-5	10,4-13,5 (11,94)	31,5-40 (36)	74,65-85 (79,8)
6-10	10,3-14,6 (12,44)	33-42 (37)	76,45-86,4 (81,44)
11-15 (masculino)	11,0-15,4 (13,2)	33-42 (39)	78-88,4 (83,2)
11-15 (feminino)	10,1-15,2 (12,67)	33-43 (38)	78-89,2 (83,6)
16-18 (masculino)	11,3-17,4 (14,35)	38-49 (43,5)	80,8-91,2 (86)
16-18 (feminino)	10,3-14,8 (12,55)	32-43 (37)	79,4-91,1 (85,3)

Limite de referência superior = média + 2 desvios-padrões (após correção de aparente erro nos dados originais publicados para o VCM).

TABELA 5.13 Limites de referência (95%) para a Hb (g/dL) em bebês pré-termo, mas com suficiência de ferro, nos primeiros 6 meses de vida [109]

	Peso ao nascer 1.000-1.500 g	Peso ao nascer 1.501-2.000 g
2 semanas	11,7-18,4	11,8-19,6
4 semanas	8,7-15,2	8,2-15,0
2 meses	7,1-11,5	8,0-11,4
3 meses	8,9-11,2	9,3-11,8
4 meses	9,1-13,1	9,1-13,1
6 meses	9,4-13,8	10,7-12,6

Foram derivados valores de referência para o Red cell Size factor (RSf) dos instrumentos Coulter, em crianças: 82-102 fL para crianças de 6 meses a 6 anos de idade, e 83,7-103,1 fL para idades de 6 a 18 anos [114].

Limites de referência na gravidez

As alterações nos parâmetros hematológicos que ocorrem durante a gravidez foram mostradas na Tabela 5.3. Valores de referência são apresentados na Tabela 5.14. A Hb geralmente permanece acima de 10 g/dL, a menos que haja deficiência de ferro ou outra complicação.

TABELA 5.14 Limites de referência (95%) para os parâmetros hematológicos durante a gravidez

Período da gestação	18 semanas		32 semanas	39 semanas
Leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	5,6-13,8*		6,0-15,7*	5,8-15,2*
Período da gestação	7-14 semanas	15-22 semanas	23-30 semanas	31-38 semanas
Hb (g/dL)	12,8-13,6 [†]	11,4-13,8 [†]	10,9-13,8 [†]	11,1-13,6 [†]
Período da gestação	Primeiro trimestre		Segundo trimestre	Terceiro trimestre
E $\times 10^6/\mu\text{L}$	3,52-4,52		3,20-4,41	3,10-4,44
Hb (g/dL)	11,0-14,3		10,0-13,7	9,8-13,7
Hct (%)	31-41		30-38	28-39
VCM (fL)	81-96		82-97	81-99
Leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	5,7-13,6		6,2-14,8	5,9-16,9; 5,9-13,7 [‡]
Neutrófilos $\times 10^3/\mu\text{L}$	3,6-10,1		3,8-12,3	3,9-13,1; 3,7-10,8 [‡]
Linfócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	1,1-3,5		0,9-3,9	1,0-3,6; 1,0-3,1 [†]
Monócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	0-1,0		0,1-1,1	0,1-1,1; 0,3-1,1 [†]
Eosinófilos $\times 10^3/\mu\text{L}$	0-0,6		0-0,6	0-0,6; 0,02-0,33 [‡]
Basófilos $\times 10^3/\mu\text{L}$	0-0,1		0-0,1	0-0,1; 0-0,09 [‡]
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	174-391		171-409	155-429
Período da gestação	18 semanas		32 semanas	39 semanas
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	155-359		146-361	139-364

*Dados derivados de Milman e colaboradores. [115]; também são fornecidos valores de referência para VCM e para Hb e CHCM expressas em mmol/L.

[†]Dados derivados de Cruikshank [116].

[‡]Dados derivados de England e Bain [117].

Todos os demais dados derivados de Balloch e colaboradores [9].

Limites de referência para a contagem de plaquetas e parâmetros plaquetários

A contagem de plaquetas ao microscópio é irrepro- dutível, e tanto esse método “manual” como a conta- gem automatizada estão sujeitas a uma significativa inacurácia. Como consequência, valores de referên- cia publicados mostram discrepâncias consideráveis

(Tabela 5.15), daí a importância dos laboratórios es- tabelecerem seus próprios limites de referência com metodologia própria. A contagem de plaquetas é mais alta em mulheres do que em homens, e o pla- quetócrito é proporcionalmente também mais al- to [52, 132-134]. Observa-se uma contagem mais baixa em africanos do que em brancos [130, 131], mas essa diferença não é significativa em afro-cari- benhos e africanos que vivem na Inglaterra [123] e

TABELA 5.15 Limites de referência (95%) para a contagem de plaquetas (× 10³/μL) em adultos sadios de várias origens étnicas

Método	Homens	Mulheres	Referência
Branços			
Microscopia	140-440		[118]
	127-351	165-359	[119]
	140-340		[119]
	145-375		[120]
Impedância em plasma rico em plaquetas	143-179	156-417	[121]
Impedância em sangue total	170-430		[122]
	168-411	188-445	[123]
	184-370	196-451	[124]
	157-365	164-384	[125]
	140-320	180-380	[39]
Dispersão de luz em sangue total	162-346*		
Hemalog 8	143-332*	169-358*	
H.1	144-328	137-347	[126]
H.2	159-376 (18 a 45 anos)		[127]
Advia 120	156-300 (45 a 65 anos)	156-351 (45 a 65 anos)	[127]
Advia 120	139-363 (> 65 anos)		[127]
Advia 120	172-398 (França)	185-445 (França)	[35]
Advia 2120	139-332 (Irã)	152-371 (Irã)	[128]
Japoneses			
Dispersão de luz em sangue total	130-350		[129]
Africanos e afro-caribenhos			
Microscopia (Nigéria)	95-278		[130]
	114-322		[130]
	100-430		[50]
Impedância (Zâmbia)	36-258		[131]
Impedância (Etiópia)	97-324	98-352	[46]
Impedância (Uganda)	80-288	100-297	[43]
Impedância (Uganda)	106-362	138-457	[44]
Sysmex KX-21N (Tanzânia)	147-356	152-425	[45]
Impedância (Gâmbia)	124-367 (limites 90%)	140-397 (limites 90%)	[47]
Impedância (Quênia)	102-307	88-439	[49]
Impedância (Ruanda, Quênia, Uganda, Zâmbia)	126-438		[48]
Impedância (africanos em Londres) (afro-caribenhos em Londres)	128-365	166-377	[123]
	210-351	160-411	[123]
Dispersão de luz (africanos em Londres) (afro-caribenhos em Londres)	118-297*	149-332*	
	134-332*	165-368*	

*Observações da autora não publicadas.

não se observa também entre negros e brancos norte-americanos [52], o que sugere que as contagens mais baixas observadas na África – embora possam ter um componente genético, pelo menos em parte – sejam causadas por fatores dietéticos ou por doença subclínica. Fatores genéticos também são operantes em populações brancas: um trabalho feito em cinco comunidades italianas isoladas encontrou diferenças significativas entre grupos; houve, também, um declínio constante com a idade [133].

A contagem de plaquetas correlaciona-se com o peso corporal: é mais alta em obesos [135].

Trabalhos antigos mostraram contagens de plaquetas similares em crianças e adultos [85, 136]. Da mesma forma, recém-nascidos, tanto prematuros como a termo, teriam contagens de plaquetas equivalentes a crianças maiores e adultos [81, 85, 136], embora bebês pequenos para a idade gestacional [81] e bebês com várias doenças tivessem contagens mais baixas. Trabalhos mais recentes, entretanto, mostram contagens de plaquetas mais altas em crianças do que em adultos (Tabela 5.16). O nivelamento ocorre na adolescência

A maioria dos instrumentos automáticos atuais mede as plaquetas ao contá-las e fornece o volume plaquetário médio (VPM). Esta é uma característica herdada que varia inversamente com a contagem de plaquetas [137]. Os valores de referência dependem muito da metodologia e dos instrumentos utilizados. Valores de referência para cinco instrumentos são

TABELA 5.16 Limites de referência (94%) para contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em crianças e adolescentes brancos saudáveis

Idade	Masculino	Feminino
Sangue do cordão* [60]	180-428	
2 meses† [95]	216-658	
5 meses† [95]	241-591	
13 meses† [95]	209-455	
4-6 anos†	213-429	220-443
7-8 anos†	211-422	218-396
9-10 anos†	166-429	197-406
1-10 anos† [127]	220-422	
11-12 anos‡	175-375	174-374
13-14 anos‡	166-360	192-439
15-19 anos‡	171-370	171-356
8-14 anos‡	193-445	183-410
15-18 anos‡	145-330	163-361
10-18 anos‡ [127]	165-396	

*Brasileiros de Porto Alegre; portanto, essencialmente brancos; Abbott Cell-Dyn 4000.

†Bayer H.1 [95] ou Advia 120 [127].

‡Coulter STKS [103, 104].

TABELA 5.17 Volume plaquetário médio (VPM em fL) em indivíduos normais [134, 138-141]

Instrumento	Princípio	VPM
Coulter STKS [139]	Impedância	7,9 (5,6-10,9)
Coulter LH 750 [138]	Impedância	8,86 (6,36-11,36)
Sysmex XE-2100 [140]	Impedância	10,5 (25 ^a -75 ^a cents, 10,2-11,2)
Sysmex XE-2100 D [138]	Impedância	10,76 (8,26-13,26)
Siemens Advia 2120 [140]	Dispersão de luz	8,2 (25 ^a -75 ^a cents, 7,8-8,7)
Siemens Advia 2120 [138]	Dispersão de luz	8,81 (5,45-12,17)
Siemens Advia 2120 [134]	Dispersão de luz	7,8 (6,7-9,6)
Abbott Cell-Dyn [141]	Impedância	(6,9-10,4)

TABELA 5.18 Comparação do volume plaquetário médio (VPM) e da amplitude de distribuição plaquetária (PDW) com as mesmas amostras avaliadas em diferentes instrumentos [142].

Instrumento	Limites de referência para VPM (fL)	Limites de referência para PDW (%)
Cell-Dyn 4000	7,6-11,0	15,0-17,2
Sysmex XE-2100	9,8-12,6	11,0-16,9
Advia 120	7,1-10,4	46,4-68,0
ABX Pentra 120	7,7-10,3	12,5-20,0
Coulter LH 750	7,9-11,3	15,6-17,5

mostrados na Tabela 5.17. A amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas (PDW, *platelet distribution width*) também pode ser fornecida; resultados de VPM e PDW medidos nas mesmas amostras em cinco diferentes instrumentos são mostrados na Tabela 5.18. VPMs mais altos podem ser preditivos de risco trombótico, tanto venoso como arterial [143].

Valores de referência para um número mais amplo de parâmetros plaquetários estão disponíveis para o Advia 2020 [134], o Cell-Dyn Sapphire [141] e o Sysmex XE-2100 [144].

Limites de referência para a contagem de reticulócitos

Limites de referência para a contagem de reticulócitos expressa em porcentagem foram publicados como sendo de 0,4 a 2% em um estudo [145], e de 0,8 a 2,5% e 0,8 a 4,1%, para homens e para mulheres, respectivamente [146], em outro estudo. Trabalhos mais recentes, com contagens automatizadas, não têm mostrado diferença entre os sexos. Contagens de

TABELA 5.19 Valores de referência para contagens de reticulócitos, manuais (ao microscópio) e automatizadas

Método	Limites 95% (mediana) da porcentagem de reticulócitos	Limites 95% (mediana) ou [média] da contagem absoluta de reticulócitos (× 10 ³ /μL)	Referência
Manual		18-158 (88)	[147]
Manual	0,8-2,5 (homens)		[146]
	0,8-4,1 (mulheres)		
Manual	0,4-2,0		[145]
Manual	0,4-2,3 (1,0)	19-111 (46)	[150]
		19-59	[148]
		40-140	[149]
Bayer Advia 120	0,6-2,5 (1,2)	27-125 (58)	[150]
		16-72 [44]	[151]
Abbott Cell-Dyn 4000	0,4-2,2 (1,3)	25-108 (57)	[150]
		19-97 [58]	[151]
Coulter Gen S	0,5-1,8 (1,0)	20-85 (43)	[150]
Coulter General S		16-79 [47,5]	[151]
Sysmex SE-9500 RET	0,5-1,9 (0,9)	23-95 (44)	[150]
		9-72 [44]	[151]
Sysmex XE-2100		27-93 (homens)	[39]
		22-76 (mulheres)	
VEGA RETIC/ABX	0,6-2,6 (1,3)	30-130 (60)	[150]
Pentra 120 Retic		16-100 [58]	[151]

TABELA 5.20 Limites de referência para contagem de reticulócitos, fração reticulocítica imatura e volume reticulocítico médio, derivados das mesmas amostras em diferentes instrumentos

Instrumento	Reticulócitos (× 10 ³ /μL) [142]	Fração reticulocítica imatura [142]	Volume reticulocítico médio (fL) [152]
Cell-Dyn 4000	28-119	0,20-0,40	
Sysmex XE-2100	27-99	0,02-0,11	
Advia 120	33-104	0,06-0,20	100-114
ABX Pentra 120	30-105	0,09-0,17	91-111
Coulter LH 750	18-114	0,22-0,40	98-120
Método de referência	29-129		

reticulócitos expressas em números absolutos são mais significativas e apropriadas para interpretação. Em uma pesquisa, encontrou-se média de 88 × 10³/μL, e limites de 18-158 × 10³/μL [147]. Valores de referência para contagens automatizadas de reticulócitos têm variado consideravelmente, de 19-59 × 10³/μL [148] a 40-140 × 10³/μL [149]. Os valores mais altos, relatados por Chin-Yee e colaboradores [149], parecem mais aceitáveis, uma vez que, nessa pesquisa, as contagens ao microscópio e as contagens automatizadas


foram semelhantes. Estes e outros limites de referência publicados estão resumidos na Tabela 5.19 e 5.20. A Tabela 5.20 também fornece valores de referência em vários instrumentos para outros parâmetros reticulocíticos, volume reticulocítico médio e fração reticulocítica imatura. Limites mais altos, aproximadamente 94-222 × 10³/μL, foram referidos no período neonatal [60]; estes dados provêm de contagens automatizadas feitas no Abbott Cell-Dyn 4000. Dados aplicáveis a lactentes são mostrados na Tabela 5.21 [95].

TABELA 5.21 Limites de referência para contagens de reticulócitos em lactentes, feitas no Advia H.1 [95]

Idade	Contagem absoluta de reticulócitos (× 10 ³ /μL)
2 meses	63-235
3 meses	41-124
13 meses	36-142

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:
www.wiley.com/go/bain/bloodcells
Senha: idiosyncratic



Referências

- Bain BJ (1989) *Blood Cells: a Practical Guide*. Gower, London.
- Moe PJ (1967) Umbilical cord blood and capillary blood in the evaluation of anaemia in erythroblastosis foetalis. *Acta Paediatr Scand*, **56**, 391–394.
- Özbek N, Gürakan B and Kayiran SM (2000) Complete blood cell counts in capillary and venous blood of healthy term newborns. *Acta Haematol*, **103**, 226–228.
- Christensen RD and Rothstein G (1979) Pitfalls in the interpretation of leukocyte counts of newborn infants. *Clin Lab Haematol*, **72**, 608–611.
- Yang Z-W, Yang S-H, Chen L, Qu J, Zhu J and Tang Z (2001) Comparison of blood counts in venous, fingertip and arterial blood and their measurement variation. *Clin Lab Haematol*, **23**, 155–159.
- Leppänen EA (1988) Experimental basis of standardized specimen collection: the effect of site of venipuncture on the blood picture, the white blood cell differential count, and the serum albumin concentration. *Eur J Haematol*, **41**, 445–448.
- Bryner MA, Houwen B, Westengard J and Klein O (1997) The spun micro-haematocrit and mean red cell volume are affected by changes in the oxygenation state of red blood cells. *Clin Lab Haematol*, **19**, 99–103.
- Campbell PJ, Aurelius S, Blowees G and Harvey J (1995) Decrease in CD4 counts with rest; implications for the monitoring of HIV infection. *Br J Haematol*, **89**, 73.
- Balloch AI and Cauchi MN (1993) Reference ranges for haematology parameters in pregnancy derived from patient populations. *Clin Lab Haematol*, **15**, 7–14.
- Beutler E and West C (2005) Hematologic differences between African-Americans and whites; the role of iron deficiency and α -thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. *Blood*, **106**, 740–745.
- Robins EB and Blum S (2007) Hematologic reference values for African American children and adolescents. *Am J Hematol*, **82**, 611–614.
- Sala C, Ciullo M, Lanzara C, Nutile T, Bione S, Mascacane R *et al.* (2008) Variation of hemoglobin levels in normal Italian populations from genetic isolates. *Haematologica*, **93**, 1372–1375.
- Patel KV (2008) Variability and heritability of hemoglobin concentration: an opportunity to improve understanding of anemia in older adults. *Haematologica*, **93**, 1281–1283.
- Beutler E, Felitti V, Gelbart T and Waalen J (2003) Haematological effects of the C282Y *HFE* mutation in homozygous and heterozygous states among subjects of northern and southern European ancestry. *Br J Haematol*, **120**, 887–893.
- Barton JC, Bertoli LF and Rothenberg BE (2000) Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J Lab Clin Med*, **135**, 96–104.
- Giorno R, Clifford JH, Beverly S and Rossing RG (1980) Hematology reference ranges. Analysis by different statistical technics and variations with age and sex. *Am J Clin Pathol*, **74**, 765–770.
- Solberg EK (1981) Statistical treatment of collected reference values and determination of reference limits. In: Grasbeck R and Alstrom W, eds. *Reference Values in Laboratory Medicine*. John Wiley, Chichester.
- Amador E (1975) Health and normality. *JAMA*, **232**, 953–955.
- Ruiz-Argüelles GJ, Sanchez-Medal L, Loria A, Piedras J and Córdova MS (1980) Red cell indices in normal adults residing at altitude from sea level to 2670 meters. *Am J Hematol*, **8**, 265–271.
- Bonfichi M, Balduini A, Arcaini L, Lorenzi A, Marseglia C, Malcovati L *et al.* (2000) Haematological modifications after acute exposure to high altitude: possible applications for detection of recombinant erythropoietin misuse. *Br J Haematol*, **109**, 895–896.
- Bowen AL, Hudson JG, Navia P, Rios-Dalenz J, Pollard AJ, Williams D and Heath D (1977) The effect of altitude on blood platelet count. *Br J Haematol*, **97**, Suppl 1, 83.
- Carballo C, Foucar K, Swanson P, Papile LA and Watterberg KL (1992) Effect of high altitude on neutrophil counts in newborn infants. *J Paediatr*, **119**, 464–466.
- Kristal-Bonch E, Froom P, Harari G, Shapiro Y and Green MS (1993) Seasonal changes in red blood cell parameters. *Br J Haematol*, **85**, 603–607.
- Kristal-Bonch E, Froom P, Harari G and Ribak J (1997) Seasonal differences in blood cell parameters and the association with cigarette smoking. *Clin Lab Haematol*, **19**, 177–181.
- Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ and Bradley J (1983) Diurnal variation of lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies. *BMJ*, **286**, 1171–1172.
- Phillips D, Rezvani K and Bain BJ (2000) Exercise induced mobilisation of the marginated granulocyte pool in the investigation of ethnic neutropenia. *J Clin Pathol*, **53**, 481–483.
- Bain BJ, Phillips D, Thomson K, Richardson D and Gabriel I (2000) Investigation of the effect of marathon running on leucocyte counts of subjects of different ethnic origins: relevance to the aetiology of ethnic neutropenia. *Br J Haematol*, **108**, 483–487.
- Bain BJ (1992) Haematological effects of smoking. *J Smoking Rel Dis*, **3**, 99–108.
- Milman N, Byg K-E, Mulvad G, Pedersen HS and Bjerregaard P (2001) Haemoglobin concentrations appear to be lower in indigenous Greenlanders than in Danes: assessment of haemoglobin in 234 Greenlanders and in 2804 Danes. *Eur J Haematol*, **67**, 23–29.
- Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E and Pratley RE (1997) Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Haematol*, **99**, 447–451.
- Nanji AA and Freeman JB (1985) Relationship between body weight and total leukocyte count in morbid obesity. *Am J Clin Pathol*, **84**, 346–347.

- 32 Cembrowski G, Qiu Y, Szkotak S, Clarke G and La M (2013) Variation in reference intervals of many complete blood count (CBC) constituents dependent on waist circumference (WC). *Int J Lab Hematol*, **35**, Suppl. 1, 15.
- 33 Waalen J, Felitti V and Beutler E (2002) Haemoglobin and ferritin concentrations in men and women: cross sectional study. *BMJ*, **325**, 137.
- 34 Nilsson-Ehle A, Jagenburg R, Landahl S and Svanborg A (2000) Blood hemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals for 70–88. *Eur J Haematol*, **65**, 297–305.
- 35 Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couailac JP, Fossat C *et al.* for the French-Speaking Cellular Hematology Group (Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire, GFHC) (2014) Full blood count normal reference values for adults in France. *J Clin Pathol*, **67**, 341–344.
- 36 Nilsson-Ehle A, Jagenburg R, Landahl S, Svanborg A and Westin J (1988) Haematological abnormalities in a 75-year-old population. Consequences for health-related reference intervals. *Eur J Haematol*, **41**, 136–146.
- 37 Yamada M, Wong FL and Suzuki G (2003) Longitudinal trends of hemoglobin levels in a Japanese population – RERF's Adult Health Study subjects. *Eur J Haematol*, **70**, 129–135.
- 38 Beutler E and Waalen J (2006) Hemoglobin levels, altitude, and smoking. *Blood*, **108**, 2131–2132.
- 39 Wakeman L, Al-Ismaïl S, Benton A, Beddall A, Gibbs A, Hartnell S *et al.* (2007) Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults. *Int J Lab Hematol*, **29**, 279–283.
- 40 Beutler E and Waalen J (2006) The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobina concentration? *Blood*, **107**, 1747–1750.
- 41 Fairbanks VF and Tefferi A (2001) Letter to the Editor. *Eur J Haematol*, **67**, 203–204.
- 42 Shaper AG and Lewis P (1971) Genetic neutropenia in people of African origin. *Lancet*, **ii**, 1021–1023.
- 43 Lugada ES, Mermin J, Haharuzza F, Ulvestad E, Were W, Langeland N *et al.* (2004) Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**, 29–34.
- 44 Eller LA, Eller MA, Ouma B, Kataaha P, Kyabaggu D, Tumusiime R *et al.* (2008) Reference intervals in healthy adult Ugandan blood donors and their impact on conducting international vaccine trials. *PLoS One*, **3**, e3919.
- 45 Saathoff E, Schneider P, Kleinfeldt V, Geis S, Haule D, Maboko L *et al.* (2008) Laboratory reference values for healthy adults from southern Tanzania. *Trop Med Int Health*, **13**, 612–625.
- 46 Tsegaye A, Messele T, Tilahun T, Hailu E, Sahlu T, Doorly R *et al.* (1999) Immunohematological reference ranges for adult Ethiopians. *Clin Diagn Lab Immunol*, **6**, 410–414.
- 47 Adetifa IMO, Hill PC, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D, Ibanga HB, Bah G *et al.* (2009) Haematological values from a Gambian cohort – possible reference range for a West African population. *Int J Lab Hematol*, **31**, 615–622.
- 48 Karita E, Ketter N, Price MA, Kayitenkore K, Kaleebu P, Nanvubya A (2009) CLSI-derived hematology and biochemistry reference intervals for healthy adults in eastern and southern Africa. *PLoS One*, **4**, e4401.
- 49 Zeh C, Amornkul PN, Inzaule S, Ondo P, Oyaro B, Mwaengo DM *et al.* (2011) Population-based biochemistry, immunologic and hematological reference values for adolescents and young adults in a rural population in Western Kenya. *PLoS One*, **6**, e21040.
- 50 Buseri FI, Siaminabo IJ and Jeremiah ZA (2010) Reference values of hematological indices of infants, children, and adolescents in Port Harcourt, Nigeria. *Path Lab Med Int*, **2**, 65–70.
- 51 Orfanakis NJ, Ostlund RE, Bishop CR and Athens JW (1970) Normal blood leukocyte concentration values. *Am J Clin Pathol*, **53**, 647–651.
- 52 Saxena S and Wong ET (1990) Heterogeneity of common hematologic parameters among racial, ethnic, and gender subgroups. *Arch Pathol Lab Med*, **114**, 715–719.
- 53 Freedman DS, Gates L, Flanders WD, Van Assendelft OW, Barboriack JJ, Joesoef MR and Byers T (1997) Black/White differences in leukocyte subpopulations in men. *Int J Epidemiol*, **26**, 757–764.
- 54 Lim E-M, Cembrowski G, Cembrowski M and Clarke G (2010) Race-specific WBC and neutrophil count reference intervals. *Int J Lab Haematol*, **32**, 590–597.
- 55 Rezvani K, Flanagan AM, Sarma U, Constantinovici N and Bain BJ (2000) Investigation of ethnic neutropenia by assessment of bone marrow colony-forming cells. *Acta Haematol*, **105**, 32–37.
- 56 Reich D, Nalls MA, Kao WH, Akyzbekova EL, Tandon A, Patterson N *et al.* (2009) Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet*, **5**, e1000360.
- 57 Hsieh M, Chin K, Link B, Stroncek D, Wang E, Everhart J *et al.* (2005) Benign ethnic neutropenia in individuals of African descent: incidence, granulocyte mobilization, and gene expression profiling. *Blood*, **106**, 858a–858b.
- 58 Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF and Rodgers GP (2007) Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences. *Ann Intern Med*, **146**, 486–492.
- 59 Marks J, Gairdner D and Roscoe JD (1955) Blood formation in infancy. Part III. Cord blood. *Arch Dis Child*, **30**, 117–120.
- 60 Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibel G, Schmidt F and Nardi NB (2001) Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematol*, **105**, 71–76.
- 61 Matoth Y, Zaizov R and Varsano I (1971) Postnatal changes in some red cell parameters. *Acta Paediatr Scand*, **60**, 317–323.

- 62 Lanzkowsky P (1960). Effects of early and late clamping of umbilical cord on infant's haemoglobin level. *BMJ*, **ii**, 1777–1782.
- 63 www.beckman.com (accessed 2005).
- 64 Saarinem UM and Siimes MD (1978) Developmental changes in red blood cell counts and indices of infants after exclusion of iron deficiency by laboratory criteria and continuous iron supplementation. *J Pediatr*, **92**, 412–416.
- 65 Serjeant GR, Grandison Y, Mason K, Serjeant B, Sewell A and Vaidya V (1980) Hematological indices in normal Negro children: a Jamaican cohort from birth to five years. *Clin Lab Haematol*, **2**, 169–178.
- 66 Scott-Emuakpor AB, Okolo AA, Omene JA and Ukpe SI (1985) The limits of physiological anaemia in the African neonate. *Acta Haematol*, **74**, 99–103.
- 67 Gregory J and Hey E (1972) Blood neutrophil response to bacterial infection in the first month of life. *Arch Dis Child*, **47**, 747–753.
- 68 Weinberg AG, Rosenfeld CR, Manroe BL and Browne R (1985) Neonatal blood cell count in health and disease. II Values for lymphocytes, monocytes, and eosinophils. *J Pediatr*, **106**, 462–466.
- 69 Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR and Brown R (1979) The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr*, **95**, 89–98.
- 70 Schmutz N, Henry E, Jopling J and Christensen RD (2008) Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. *J Perinatol*, **28**, 275–281.
- 71 Chan PCY, Hayes L and Bain BJ (1985) A comparison of the white cell counts of cord bloods from babies of diferente ethnic origins. *Ann Trop Paediatr*, **5**, 153–155.
- 72 Xanthou M (1970) Leucocyte blood picture in full-term and premature babies during neonatal period. *Arch Dis Child*, **45**, 242–249.
- 73 Cranendonk E, van Gennip AH, Abeling NGGM, Behrendt H and Hart AA (1985) Reference values for automated cytochemical differential count of leukocytes in children 0–16 years old: a comparison with manually obtained counts from Wright-stained smears. *J Clin Chem Clin Biochem*, **23**, 663–667.
- 74 Dallman PR and Siimes MA (1979) Percentile curves for hemoglobin and red cell volume in infancy and childhood. *J Pediatr*, **94**, 26–31.
- 75 Katsares V, Pararidis Z, Nikolaidou E, Karvounidou I, Ardean K-A, Drossas N *et al.* (2008) References ranges for umbilical cord blood hematological values. *Lab Med*, **40**, 437–439.
- 76 Aneja S, Manchanda R, Patwari A, Sagreia K and Bhargava SK (1979) Normal hematological values in newborns. *Indian Pediatr*, **16**, 781–786.
- 77 Ezeilo GC (1978) A comparison of the haematological values of cord bloods of African, European and Asian neonates. *Afr J Med Sci*, **7**, 163–169.
- 78 Green DW and Mimouni F (1990) Nucleated erythrocytes in healthy infants and in infants of diabetic mothers. *J Pediatr*, **116**, 129–131.
- 79 Frazier JP, Cleary TG, Pickering LK, Kohl S and Ross PJ (1982) Leukocyte function in healthy neonates following vaginal and cesarean section deliveries. *J Pediatr*, **101**, 269–272.
- 80 Harrison KL (1979) The effect of maternal smoking on neonatal leucocytes. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*, **19**, 166–168.
- 81 McIntosh N, Kempson C and Tyler RM (1988) Blood counts in extremely low birth weight infants. *Arch Dis Child*, **63**, 74–76.
- 82 Özyürek E, Çetintaş S, Ceylan T, Ögüç E, Haberal A, Gürakan B and Özbek N (2006) Complete blood count parameters for healthy, small-for-gestational-age, full-term newborns. *Clin Lab Haematol*, **28**, 97–104.
- 83 Green DW, Hendon B and Mimouni FB (1995) Nucleated erythrocytes and intraventricular haemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics*, **96**, 475–478.
- 84 Playfair JHL, Wolfendale MR and Kay HEM (1963) The leucocytes of peripheral blood in the human foetus. *Br J Haematol*, **9**, 336–344.
- 85 Millar DS, Davis LR, Rodeck CH, Nicolaides KH and Mibashan RS (1985) Normal blood cell values in the early mid-trimester fetus. *Prenat Diagn*, **5**, 367–373.
- 86 Forestier F, Daffos F, Galactéros F, Bardakjian J, Rainaut M and Beuzard Y (1986) Haematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Paediatr Res*, **20**, 342–346.
- 87 Mari G, Zimmerman R and Oz U (2000) Non-invasive diagnosis of fetal anemia by Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*, **343**, 67–68.
- 88 Srisupundit K, Piyamongkol W and Tongsong T (2008) Comparison of red blood cell hematology among normal, α -thalassemia-1 trait, and haemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy. *Am J Hematol*, **83**, 908–910.
- 89 Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD and Daffos F (1994) Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood*, **84**, 1851–1856.
- 90 Forestier F, Hohlfeld P, Vial Y, Olin V, Andreux J-P and Tissot J-D (1996) Blood smears and prenatal diagnosis. *Br J Haematol*, **95**, 278–280.
- 91 Coulombel L, Dehan M, Tchernia G, Hill C and Vial M (1979) The number of polymorphonuclear leukocytes in relation to gestational age in the newborn. *Acta Paediatr Scand*, **68**, 709–711.
- 92 Zaizov R and Matoth Y (1976) Red cell values on the first postnatal day during the last sixteen weeks of gestation. *Am J Hematol*, **1**, 275–278.
- 93 Castriota-Scanderberg A, Fedrazzi G, Mercadanti M, Stapanie I, Butturini A and Izzi G (1992) Normal values of total reticulocytes and reticulocyte subsets in children and young adults. *Haematologica*, **77**, 363–364.
- 94 Dallman PR, Looker AC, Johnson CL and Carroll M (1996) Influence of age on laboratory criteria for the diagnosis of iron deficiency in infants and children. In: Hallberg L and Asp NG (eds) *Iron Nutrition in Health and Disease*. John Libbey, London, quoted by Wharton BA (1999) Iron deficiency in children: detection and prevention. *Br J Haematol*, **106**, 270–280.

- 95 Hinchliffe RF, Bellamy GJ, Bell F, Finn A, Vora AJ and Lennard L (2013) Reference intervals for red cell variables and platelet counts in infants at 2, 5 and 13 months of age: a cohort study. *J Clin Pathol*, **66**, 962–966.
- 96 Hunter RE and Smith NJ (1972) Hemoglobin and hematocrit values in iron deficiency in infancy. *J Pediatr*, **81**, 710–713.
- 97 Burman D (1972) Haemoglobin levels in normal infants aged 3 to 24 months, and the effect of iron. *Arch Dis Child*, **47**, 261–271.
- 98 Emond AM, Hawkins N, Pennock C, Golding J and the ALSPAC Children in Focus Study Team (1996) Haemoglobin and ferritin concentrations in infants at 8 months of age. *Arch Dis Child*, **74**, 36–69.
- 99 Sheriff A, Emond A, Hawkins N, Golding J and the ALSPAC Children in Focus Study Team (1999) Haemoglobin and ferritin concentrations in children aged 12 and 18 months. *Arch Dis Child*, **80**, 153–157.
- 100 Morley R, Abbott R, Fairweather-Tait S, MacFadyen U, Stephenson T and Lucas A (1999) Iron fortified follow on formula from 9 to 18 months improves iron status but not development or growth: a randomised trial. *Arch Dis Child*, **81**, 247–252.
- 101 Viteri FE, de Tuna V and Guzmán MA (1972) Normal haematological values in the Central American population. *Br J Haematol*, **23**, 189–204.
- 102 Natvig H and Vellar OD and Andersen J (1967) Studies on hemoglobin value in Norway. VII. Hemoglobin, hematocrit and MCHC values among boys and girls aged 7–20 years in elementary and grammar school. *Acta Med Scand*, **182**, 183–191.
- 103 Taylor MRH, Holland CV, Spencer R, Jackson JF, O'Connor GI and O'Donnell JR (1997) Haematological references ranges for schoolchildren. *Clin Lab Haematol*, **19**, 1–15.
- 104 Flegar-Mč štrić Z, Nazor A and Jagarinic N (1999) Reference intervals for haematological parameters in urban school children. *Clin Lab Haematol*, **21**, 72–74.
- 105 Bellamy GJ, Hinchliffe RF, Crawshaw KJ, Finn AH and Bell F (2000) Total and differential leucocyte counts in infants at 2, 5 and 13 months of age. *Clin Lab Haematol*, **22**, 81–87.
- 106 Dallman PR (1991) Blood and blood forming tissues. In Rudolph AM and Hoffman JIE (eds), *Rudolph's Pediatrics*, 19th edn. Appleton & Lange, New York.
- 107 Osgood EE, Brownlee IE, Osgood MW, Ellis DM and Cohen W (1939) Total, differential and absolute leucocyte counts and sedimentation rates of healthy children four to seven years of age. *Am J Dis Child*, **58**, 61–70.
- 108 Osgood EE, Brownlee IE, Osgood MW, Ellis DM and Cohen W (1939) Total, differential and absolute leucocyte counts and sedimentation rates of healthy children. Standards for children eight to fourteen years of age. *Am J Dis Child*, **58**, 282–294.
- 109 Lundstrom U, Siimes MA and Dallman PR (1977) At what age does iron supplementation become necessary in lowbirth-weight infants. *J Pediatr*, **91**, 878–883.
- 110 Andersson O, Hellström-Westas L, Andersson D and Domellöf M (2011) Effect of delayed versus early umbilical cord clamping on neonatal outcomes and iron status at 4 months: a randomised controlled trial. *BMJ*, **343**, 1244.
- 111 Caramihai E, Karayalcin G, Aballi AJ and Lankowsky P (1975) Leukocyte count differences in healthy white and black children 1 to 5 years of age. *J Pediatr*, **86**, 252–254.
- 112 Sadowitz PD and Oski FA (1983) Differences in polymorphonuclear cell counts between healthy white and black infants: response to meningitis. *Pediatrics*, **72**, 405–407.
- 113 Williams TN, Maitland K, Ganczakowski M, Peto TEA, Clegg JB, Weatherall DJ and Bowden DK (1996) Red blood cells phenotypes in the α^+ thalassaemias from early childhood to maturity. *Br J Haematol*, **95**, 266–272.
- 114 Osta V, Caldirola MS, Fernandez M, Marcone MI, Tissera G, Pennesi S and Ayuso C (2013) Utility of new mature erythrocyte and reticulocyte indices in screening for iron-deficiency anemia in a pediatric population. *Int J Lab Hematol*, **35**, 400–405.
- 115 Milman N, Bergholt T, Byg K, Eriksen L and Hvas AM (2007) Reference intervals for haematological variables during normal pregnancy and postpartum in 434 healthy Danish women. *Eur J Haematol*, **79**, 39–46.
- 116 Cruikshank JM (1970) Some variations in the normal haemoglobin concentration. *Br J Haematol*, **18**, 523–529.
- 117 England JM and Bain BJ (1976) Annotation: total and differential leucocyte count. *Br J Haematol*, **33**, 1–7.
- 118 Brecher G and Cronkite EP (1950) Morphology and enumeration of human blood platelets. *J Appl Physiol*, **3**, 365–377.
- 119 Sloan AW (1951) The normal platelet count in man. *J Clin Pathol*, **4**, 37–46.
- 120 Miale JB (1982) *Laboratory Medicine Hematology*, 6th edn. CV Mosby, St Louis.
- 121 Bain BJ and Forster T (1980) A sex difference in the bleeding time. *Thromb Haemostas*, **43**, 131–132.
- 122 Giles C (1981) The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol*, **48**, 31–37.
- 123 Bain BJ and Seed M (1986) Platelet count and platelet size in Africans and West Indians. *Clin Lab Haematol*, **8**, 43–48.
- 124 Payne BA and Pierre RV (1986) Using the three-part differential. Part 1. Investigating the possibilities. *Lab Med*, **17**, 459–462.
- 125 Gladwin AM, Trowbridge EA, Slater DN, Reardon D and Martin JF (1990) The size and number of bone marrow megakaryocytes in malignant lymphoma and their relationship to the platelet count. *Am J Hematol*, **35**, 225–231.
- 126 Brummitt DR and Barker HF (2000) The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIA™ 120 full blood count analyser. *Clin Lab Haematol*, **22**, 103–107.

- 127 Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, Antico F, Valverde S, Salvadego MM and Manoni F (2001) Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA™ 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haematol*, **23**, 181–186.
- 128 Adibi P, Faghih Imani E, Talaei M and Ghanei M (2007) Population-based platelet reference values for an Iranian population. *Int J Lab Hematol*, **29**, 195–199.
- 129 Takamatsu N, Yamamoto H, Onomura Y and Ichikawa N (1992) A study of the hematological reference ranges and changes with age using the automated hematology analyzer K-1000™. *Sysmex J Int*, **2**, 136–145.
- 130 Essien EM, Usanga EA and Ayeni O (1973) The normal platelet count and platelet factor 3 availability in some Nigerian population groups. *Scand J Haematol*, **10**, 378–383.
- 131 Gill GV, England A and Marshal C (1979) Low platelet counts in Zambians. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **73**, 111–112.
- 132 Bain BJ (1985) Platelet count and platelet size in men and women. *Scand J Haematol*, **35**, 77–79.
- 133 Biino G, Gasparini P, D'Adamo P, Ciullo M, Nutile T, Toniolo D *et al.* (2012) Influence of age, sex and ethnicity on platelet count in five Italian geographic isolates: mild thrombocytopenia may be physiological. *Br J Haematol*, **157**, 384–387.
- 134 Kim MJ, Park P-W, Seo Y-H, Kim K-H, Seo JY, Jeong JH *et al.* (2013) Reference intervals for platelet parameters in Korean adults using Advia 2120. *Ann Lab Med*, **33**, 364–366.
- 135 Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E and Pralley RE (1997) Relationship of the white blood cell count to role of leptin. *Br J Haematol*, **99**, 447–451.
- 136 Sell EJ and Corrigan JJ (1973) Platelet counts, fibrinogen concentrations, and factor V and factor VII levels in healthy infants according to gestational age. *J Pediatr*, **82**, 1028–1032.
- 137 Soranzo N, Spector TD, Mangino M, Kühnel B, Rendon A, Teumer A *et al.* (2009) A genome-wide meta-analysis identified 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat Genet*, **41**, 1182–1190.
- 138 Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P and Lecompte T (2012) Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of morphological phenotype. *Int J Lab Hematol*, **34**, 300–310.
- 139 Pathepchotiwong K, Dhareruchta P and Adirojananon W (2001) Platelet parameter in healthy subjects analyzed by automation analyzer. *Thai J Hematol Transfus Med*, **11**, 93–100, cited by Latger-Cannard *et al.* [138].
- 140 Noris P, Klersy C, Zecca M, Arcaini L, Pecci A, Melazzini F *et al.* (2009) Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, **7**, 2131–2136.
- 141 Hoffmann JJML, van den Broek NMA and Curvers J (2013) Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Arch Pathol Lab Med*, **137**, 1635–1640.
- 142 Doretto P, Biasioli B, Casolari B, Pasini L, Bulian P, Buttarello M *et al.* (2011) Conteggio reticulocitario automatizzato: valutazione NCCLS H-44 ed ICSH su 5 strumenti. In: Cenci A and Cappelletti P (eds) *Appunti di Ematologia di Laboratorio*. MAF Servizi Editore, Turin.
- 143 Machin SJ and Briggs C (2010) Commentary: mean platelet volume: a quick, easy determinant of thrombotic risk? *J Thromb Haemostas*, **8**, 146–147.
- 144 Ko YJ, Kim H, Hur M, Choi SG, Moon H-W, Yun Y-M and Hong SN (2013) Establishment of reference interval for immature platelet fraction. *Int J Lab Hematol*, **35**, 528–533.
- 145 Crouch JY and Kaplow LS (1985) Relationship of reticulocyte age to polychromasia, shift cells and shift reticulocytes. *Arch Pathol Lab Med*, **109**, 325–329.
- 146 Deiss A and Kurth D (1970) Circulating reticulocytes in normal adults as determined by the new methylene blue method. *Am J Clin Pathol*, **53**, 481–484.
- 147 Lee GR (1981) Normal blood and bone marrow values in men. In: Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW and Lukens IN (eds) *Clinical Hematology*, 8th edn. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 148 Nobes PR and Carter AB (1990) Reticulocyte counting using flow cytometry. *J Clin Pathol*, **43**, 675–678.
- 149 Chin-Yee I, Keeney M and Lehmann C (1991) Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange: clinical experience and technical limitations. *Clin Lab Haematol*, **13**, 177–188.
- 150 Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E and Rizzotti P (2000) Flow cytometric reticulocyte counting: parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol*, **115**, 100–111.
- 151 Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, van de Vyvere M and Schouwer P (2001) Comparison of the reticulocyte mode of the Abx Pentra 120Retic, Coulter General-S, Sysmex SE 9500, Abbott CD 4000 and Bayer Advia 120 haematology analysers in a simultaneous evaluation. *Clin Lab Haematol*, **23**, 355–360.
- 152 Cappelletti P, Biasioli B, Buttarello M, Bulian P, Casolari B, Cenci A *et al.* (2011) Mean reticulocyte volume (MCVr): intervalli di riferimento e necessità di standardizzazione. In: Cenci A and Cappelletti P (eds) *Appunti di Ematologia di Laboratorio*. MAF Servizi Editore, Turin.

CAPÍTULO 6

Alterações quantitativas das células sanguíneas

Este capítulo aborda as alterações quantitativas das células sanguíneas; primeiramente, as causas de elevação das contagens de cada linhagem celular e, em seguida, as causas de diminuição. O aumento numérico de um tipo celular, medido laboratorialmente em amostra de sangue periférico, resulta de redistribuição ou de aumento da liberação medular da célula respectiva; às vezes, o aumento da contagem, o que se nota sobretudo na série eritroide, pode resultar da diminuição do volume plasmático. A diminuição da contagem de um tipo celular pode decorrer de diminuição da liberação medular, redistribuição ou sobrevida encurtada na circulação; na série eritroide, também pode decorrer de aumento do volume plasmático.

Poliglobulia

O termo poliglobulia*, de modo estrito, indica o aumento do número de eritrócitos (E) na circulação, mas costuma ser usado somente quando há aumento simultâneo da hemoglobina (Hb) e do hematócrito (Hct) acima dos valores de referência para a idade e o sexo do indivíduo. De um modo geral, o aumento de E, Hb e Hct é paralelo. Convencionalmente, o termo poliglobulia não se refere à contagem eritrocitária aumentada se a Hb for normal ou diminuída, o que pode acontecer, por exemplo, na talassemia menor; o termo eritrocitose é aplicável em tais casos. O aumento dessas cifras hematimétricas pode resultar de uma diminuição aguda ou crônica do volume plasmático. A diminuição aguda pode ser causada pela síndrome de choque, quando há perda de líquido do compartimento intravascular, ou por desidratação. Uma poliglobulia aparente intermitente, que pode ser significativa, ocorre na síndrome de excessiva permeabilidade capilar idiopática [1]. Também

pode ocorrer na síndrome de choque tóxico, decorrente de toxina bacteriana, ou pela hiperpermeabilidade capilar associada a febres virais hemorrágicas. A ingestão rápida de 1 litro de água causa um aumento transiente das cifras eritroides por aumento da atividade simpática, seguida de redução gradual [2]; é improvável que essa poliglobulia fugaz seja notada a não ser quando experimentalmente provocada. Uma diminuição crônica do volume plasmático deve-se, às vezes, ao tabagismo, mas em muitos casos não tem causa aparente. O fenômeno foi chamado de “poliglobulia do estresse”, porém, os termos “pseudopoliglobulia” ou “poliglobulia relativa” são mais adequados, já que não há um relacionamento claro com o estresse.

De maneira alternativa, o aumento de E, Hb e Hct pode ser causado por uma poliglobulia verdadeira, isto é, por aumento do volume total de eritrócitos circulantes, também designado inaccuradamente “massa eritrocitária”. A poliglobulia verdadeira pode ser primária ou secundária. Na poliglobulia primária, há um distúrbio intrínseco da medula óssea, herdado ou adquirido. A concentração de eritropoetina está diminuída. Em contrapartida, a poliglobulia secundária é mediada pela produção aumentada de eritropoetina, ocorrendo como resposta fisiológica à hipoxia, ou como resultado de secreção inapropriada de eritropoetina, por um rim doente ou por um tumor. Causas de poliglobulia estão resumidas na Tabela 6.1, enquanto o diagnóstico diferencial da policitemia vera (PV) é discutido no Capítulo 8. Os recém-nascidos têm Hb mais alta do que os adultos, mas a Hb pode aumentar ainda mais em condições patológicas; algumas causas de poliglobulia próprias do período neonatal são resumidas na Tabela 6.2.

Reticulocitose

Tanto a porcentagem de reticulócitos como a contagem absoluta, ou ambas, podem estar aumentadas. Com raras exceções, uma porcentagem aumentada

*N. de T. No original inglês, o termo usado é *polycythaemia* (policitemia); no Brasil, prefere-se “poliglobulia”, reservando-se “policitemia” para designar a neoplasia mieloproliferativa “policitemia vera”.

TABELA 6.1 Algumas causas de poliglobulia

Primária	Capacidade inadequada de transporte de oxigênio Intoxicação crônica pelo monóxido de carbono [18], ou tabagismo intenso, tanto com fumo de cigarros como de narguilê (<i>shisha</i>) [19] Metemoglobinemia ou sulfemoglobinemia crônicas causadas por drogas ou agentes químicos
Hereditária	Resultante da síntese inapropriada ou de administração de eritropoetina (presuntiva ou comprovada) ou andrógenos [20, 21] Doenças renais, incluindo carcinoma (hiper nefroma), tumor de Wilms, adenoma renal, hemangioma renal, sarcoma renal, cistos renais (incluindo doença renal policística), estenose da artéria renal, trombose da veia renal, poliglobulia pós-transplante, hidronefrose, rim em ferradura, nefrocalcinose (incluindo a causada por hiperparatireoidismo), síndrome de Bartter, linfangiectasias renais [22], linfangioma perirrenal [23] Hiperparatireoidismo [24] Hemangioblastoma cerebelar Meningioma Lesões hepáticas, incluindo hepatoma, hamartoma hepático, angiossarcoma hepático, hemangioma hepático e no começo de hepatites infecciosas [25] Leiomioma (fibroide) uterino Tumores de suprarenal, ovário, pulmão, timo, paratireoide (carcinoma/adenoma) Feocromocitoma [26] Mixoma atrial [27] Síndrome de Cushing e aldosteronismo primário Administração de eritropoetina (p. ex., uso ilícito em atletas) Hiperandrogenismo gestacional [28] Administração de andrógeno ou tumores secretores de andrógeno, em mulheres Abuso de andrógenos em homens (p. ex., em atletas) [29] Síndrome TEMPI (Telangiectasia, eritropoietina Elevada, gamopatia Monoclonal, coleção fluida Perinéfrica, shunt Intrapulmonar) [30]
Secundária	Sangue usado como dope Transfusões homólogas ou autotransfusões ilícitas, por atletas [19]
Causada por hipoxia tecidual	Outros mecanismos ou mecanismos desconhecidos
Hereditária	Hereditários Alguns casos familiares [31]
Adquirida	Adquiridos Toxicidade por cobalto [32] Doença de Monge (eritrocitose excessiva da altitude – possivelmente relacionada a toxicidade por cobalto [33]) Associada à síndrome POEMS (Polineuropatia, Organomegalia, Endocrinopatia, proteína M, alterações cutâneas (Skin changes) [34] Administração de antirreceptor de fator de crescimento endotelial (semaxanibe) no tratamento da síndrome de von Hippel-Lindau [35] Tratamento com romiplostim [36] Tratamento com sorafenibe e sunitinibe [37]
Adquirida	
Hipoxia	
Residência em altitude elevada	
Uso de altitude simulada para treinamento atlético (tenda hipóxica ou “leito de altitude elevada”)	
Cardiopatia cianótica	
Doença pulmonar hipóxica crônica	
Apneia [15]* do sono ou outras síndromes de hipoventilação, incluindo a obesidade mórbida (síndrome de Pickwick)	
Cirrose hepática (decorrente de shunt arteriovenoso pulmonar) [16]	
Malformações arteriovenosas pulmonares na telangiectasia hemorrágica hereditária [17]	

*Apneia obstrutiva do sono causa apenas pequeno aumento do hematócrito, que pode representar poliglobulia relativa [15].

NAD, nicotinamida adenina dinuclestídio, NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.

indica proporção aumentada de eritrócitos jovens. Também com raras exceções, uma contagem absoluta aumentada indica aumento de liberação de eritrócitos da medula óssea. Geralmente, ambas

aumentam juntas, mas, em pacientes muito anêmicos, pode haver aumento da porcentagem sem aumento do número absoluto. Causas de reticulocitose são mostradas na Tabela 6.3.

TABELA 6.2 Algumas causas de poliglobulia particularmente importantes ou peculiares ao período neonatal

Transfusão intrauterina gêmeo-gemelar
Transfusão intrauterina materno-fetal
Insuficiência placentária e hipoxia intrauterina
Bebês pequenos para a idade gestacional
Bebês pós-maturos
Hipertensão materna associada à gravidez
Tabagismo materno
Diabetes melito materno
Anormalidades cromossômicas
Síndrome de Down
Síndrome de trissomia 13
Síndrome de trissomia 18
Tireotoxicose neonatal
Hipotireoidismo neonatal
Hiperplasia suprarrenal congênita
Clampeamento tardio do cordão
Parto subaquático com clampeamento tardio do cordão [38]

TABELA 6.3 Causas de reticulocitose

Causas comuns
Encurtamento da sobrevida eritrocitária (i.e., anemia hemolítica)
Perda sanguínea recente
Resposta a tratamento em paciente com deficiência de ácido fólico, vitamina B ₁₂ ou ferro
Recuperação de supressão ou insuficiência da medula óssea ou do tecido eritroide
Administração de eritropoetina
Hipoxia
Diabetes melito (possivelmente indicando hemólise compensada) [39]
Causas raras
Maturação retardada dos reticulócitos (nas síndromes mielodisplásicas)
Hemocromatose genética [40]

Leucocitose

É o aumento na contagem global de leucócitos. Na maioria das vezes resulta de aumento de neutrófilos, algumas vezes de linfócitos, menos comumente de eosinófilos, ocasionalmente da presença no sangue de células mieloides ou linfoides anormais. Uma leucocitose não pode ser interpretada sem conhecimento da contagem diferencial; em locais sem recursos para uma fórmula leucocitária, pode ser usada como dado sugestivo na suspeita de neutrofilia. Leucocitose é preditiva de um pior prognóstico na anemia de células falciformes [41]. É indicador prognóstico adverso em síndrome coronária aguda, acidente vascular cerebral e embolia pulmonar

[42]. A contagem de leucócitos faz parte do escore de Alvarado para o diagnóstico presuntivo de apendicite aguda [43].

Neutrofilia

Neutrofilia (neutrocitose), ou leucocitose neutrófila, é a elevação da contagem absoluta de neutrófilos acima da que seria esperada em um indivíduo sadio de mesmo sexo, idade, etnia e estado fisiológico. Recém-nascidos sadios têm contagem de neutrófilos acima da normalmente encontrada em outros estágios da vida, além de desvio à esquerda. De maneira análoga, as mulheres em idade de reprodução apresentam contagens de neutrófilos um pouco mais altas do que os homens; a contagem varia com o ciclo menstrual. Durante a gravidez, há considerável aumento na contagem de neutrófilos, que se acentua ainda mais durante o trabalho de parto e no período pós-parto; além disso, há desvio à esquerda (aparecendo mielócitos e até mesmo raros promielócitos no sangue), com granulações “tóxicas” e corpos de Döhle.

Neutrofilia geralmente é oriunda de redistribuição dos neutrófilos ou de aumento de liberação pela medula óssea. Pode raramente dever-se a prolongamento do período de permanência dos neutrófilos no sangue periférico. O exercício pode alterar a distribuição dos leucócitos na circulação, causando mobilização para a corrente sanguínea de células previamente marginadas contra o endotélio. O exercício vigoroso pode duplicar a contagem de neutrófilos; o número absoluto de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos também aumenta, mas, como o aumento do número de neutrófilos é mais acentuado, o aumento dos outros tipos celulares pode passar despercebido. Quando o exercício é intenso e prolongado, pode ocorrer desvio à esquerda, indicando que, além da redistribuição, há aumento da liberação medular. Os pacientes geralmente não se submetem a exercício intenso antes da coleta de sangue para exame, mas a administração de adrenalina (epinefrina) e convulsões epileptiformes podem mobilizar os neutrófilos de maneira análoga, e até mesmo uma dor intensa pode ter efeito sobre a contagem de neutrófilos. Os corticoides também alteram a cinética dos neutrófilos. A liberação pela medula óssea é aumentada e há diminuição concomitante do egresso para os tecidos. Experimentos em coelhos indicam haver, também, mobilização do *pool* granulocítico marginal [44].

TABELA 6.4 Algumas causas de neutrofilia

<p>Hereditárias</p> <p>Como efeito direto da condição</p> <p>Neutrofilia hereditária [45], alguns casos devidos à mutação de <i>CSF3R</i> que codifica o receptor para o G-CSF [46]</p> <p>Deficiência genética de receptores do complemento CR3 [47]</p> <p>Expressão deficiente das moléculas de adesão na superfície dos leucócitos, CD11b ou CD15 (deficiências de adesão de leucócitos tipos I e II) [48, 49, 50]</p> <p>Rearranjo defeituoso da integrina em resposta a citocinas e quimiotáticos, deficiência de quindlina 3 [51, 52]</p> <p>Associada com trombocitopenia autossômica dominante devida à mutação de <i>ANKRD26</i> [53]</p> <p>Como efeito indireto da condição</p> <p>Urticária familiar ao frio com leucocitose [54]</p> <p>Síndrome de hiperimmunoglobulina D [55]</p> <p>Síndromes de febre periódica familiar, incluindo febre mediterrânea, síndrome periódica associada ao receptor do TNF (TRAPS) [55] e hiperimmunoglobulina D com febre periódica</p> <p>Doença autoinflamatória devida à deficiência de antagonista do receptor da IL-1 [56]</p> <p>Distúrbios metabólicos hereditários, como deficiência de ornitina transcarbamilase [57]</p> <p>Adquiridas</p> <p>Infeções</p> <p>Muitas infecções bacterianas agudas e crônicas, incluindo tuberculose miliar e algumas infecções por riquétsia, como a febre maculosa das Montanhas Rochosas (infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i>), infecção por <i>Rickettsia parkeri</i> e alguns casos de tifo e tifo murino</p> <p>Síndrome de choque tóxico</p> <p>Algumas infecções virais, como varicela, herpes simples, raiva, poliomielite, infecção por vírus da encefalite de Saint Louis, infecção por vírus da encefalite equina oriental, infecção por hantavírus, incluindo síndrome pulmonar por hantavírus (infecção por vírus Sin Nombre) [58, 59], encefalite japonesa [60], citomegalovirose [61]</p> <p>Algumas infecções fúngicas, como actinomicose, coccidioidomicose, blastomicose norte-americana, nocardiose [62], síndrome cepácia (colonização dos pulmões por <i>Burkholderia cepacia</i> na fibrose cística) [63], criptococose [64]</p> <p>Algumas parasitoses, como fasciolíase hepática, amebíase hepática, filariose, malária [65], algumas infecções por <i>Pneumocystis jirovecii</i>, enterite por <i>Cystoisospora belli</i> [66]</p> <p>Dano tecidual, como trauma, cirurgia (particularmente esplenectomia), queimaduras, necrose hepática aguda, pancreatite aguda, síndrome hemolítico-urêmica, intoxicação por cianeto de potássio [67]</p> <p>Infarto tecidual, como infarto do miocárdio, embolia pulmonar causando infarto pulmonar, crise na anemia de células falciformes, doença ateroembólica</p>	<p>Inflamação aguda e inflamação crônica severa, por exemplo, gota, pseudogota (doença de deposição de cristais de pirofosfato de cálcio), febre reumática, artrite reumatoide, doença de Still, colite ulcerativa, enterite necrosante, poliartrite nodosa, escleroderma, exantema pustuloso generalizado agudo [68]</p> <p>Hemorragia aguda</p> <p>Hipoxia aguda</p> <p>Estresse pelo calor [69]</p> <p>Afogamento</p> <p>Distúrbios endócrinos e metabólicos, como cetoacidose diabética, insuficiência renal aguda, síndrome de Cushing, crise tireotóxica</p> <p>Doenças malignas, como carcinoma, sarcoma, melanoma, linfoma de Hodgkin (particularmente, mas não apenas, quando há doença extensa ou necrose tumoral) – às vezes relacionada a secreção de G-CSF pelo tumor, como no mieloma múltiplo [70] e carcinoma renal de células fusiformes [71]</p> <p>Distúrbios leucêmicos e mieloproliferativos, como leucemia mieloide crônica, leucemia mielomonocítica crônica, leucemia neutrofílica, leucemia mieloide aguda (raramente), outras leucemias raras, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária (no início da doença), mastocitose sistêmica</p> <p>Rebote pós-neutropenia, por exemplo, após a neutropenia induzida por diálise, na recuperação da agranulocitose e da quimioterapia citotóxica, no tratamento da anemia megaloblástica</p> <p>Administração de citocinas, como G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2 [72], IL-3 [73], IL-6 [74], IL-10 [75]</p> <p>Administração de fármacos, como adrenalina, corticoides, lítio, clozapina [76], desmopressina [77], início de tratamento com rituximabe [78], plerixafor (antagonista de CXCR4) [79]</p> <p>Intoxicação por vários tipos de drogas e agentes químicos, como etilenoglicol [80], ferro</p> <p>Reações de hipersensibilidade, incluindo as causadas por drogas</p> <p>Envenenamento, como picada de escorpião [81], ataque de “abelhas assassinas” [82], picada de ofídio [83]</p> <p>Tabagismo [84]</p> <p>Exercício vigoroso</p> <p>Dor aguda, convulsões epiléticas, choque elétrico, taquicardia paroxística</p> <p>Eclâmpsia e pré-eclâmpsia (hipertensão associada à gravidez)</p> <p>Doença de Kawasaki</p> <p>Síndrome de Sweet [85]</p> <p>Síndrome neuroléptica maligna [86]</p> <p>Transfusão de sangue em pacientes em estado crítico [87]</p> <p>Infusão de crioprecipitado [88]</p> <p>Neutrofilia crônica idiopática [89]</p>
--	---

G-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas; GM-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas e macrofágicas; IL, interleuquina; TNF, fator de necrose tumoral.

TABELA 6.5 Causas significativas de neutrofilia no recém-nascido

Fatores maternos
Tabagismo
Febre
Administração prolongada de ocitocina durante o parto
Administração de dexametasona
Fatores fetais
Parto estressante
Asfixia ao nascimento ou outro tipo de hipoxia
Choro
Fisioterapia
Dor, por exemplo, à punção lombar
Hipoglicemia
Convulsões
Infecção
Hemólise
Hemorragia intraventricular
Síndrome de aspiração de mecônio
Doença da membrana hialina com pneumotórax
Trombocitopenia com rádios ausentes (síndrome TAR)

O aumento da contagem de leucócitos inicia algumas horas após a administração intravenosa ou depois de 1 dia de administração oral; a leucocitose pode ultrapassar $20 \times 10^3/\mu\text{L}$. A elevação deve-se predominantemente a neutrofilia, mas também há aumento do número absoluto de monócitos, acompanhado de queda do número absoluto de eosinófilos e de linfócitos. A adrenalina e os corticoides não causam granulação tóxica, aparecimento de corpos de Döhle, desvio à esquerda ou vacuolização neutrófila.

Neutrofilia em condições patológicas costuma resultar de um aumento da liberação de neutrófilos da medula óssea, que compensa com superávit a saída aumentada para os tecidos. A Tabela 6.4 mostra as principais causas de neutrofilia, incluindo algumas menos significativas; a Tabela 6.5, algumas causas de neutrofilia particularmente importantes no período neonatal.

A neutrofilia pode ter significação prognóstica adversa. Isso está confirmado em relação ao prognóstico a longo prazo na anemia de células falciformes, e em relação ao prognóstico a curto prazo na angina instável e após infarto do miocárdio.

Eosinofilia

Eosinofilia, ou leucocitose eosinófila, é a elevação da contagem absoluta de eosinófilos acima dos níveis

TABELA 6.6 Algumas das causas mais comuns de eosinofilia

Doenças alérgicas, como eczema atópico, asma, rinite alérgica (febre do feno), urticária aguda, aspergilose broncopulmonar alérgica e outras infecções fúngicas broncoalérgicas, doença de precipitinas séricas a proteínas do leite [90]
Hipersensibilidade medicamentosa (particularmente a ouro, sulfonamidas, penicilina e nitrofurantoína), incluindo síndrome de Churg-Strauss ou síndrome de eosinofilia-mialgia [91, 92]
Infecção parasitária (particularmente quando há invasão tecidual) – ver Tabela 6.7
Doenças cutâneas, como pênfigo, penfigoide bolhoso, dermatite herpetiforme, herpes gestacional, foliculite pustular eosinofílica [93], síndrome de descamação cutânea familiar [94], exantema pustuloso generalizado agudo (alguns casos) [68]

observados em indivíduos saudáveis, de mesma idade, sem história de alergia. As contagens de eosinófilos são mais altas em recém-nascidos do que em adultos; em idosos, há lento declínio das contagens. O número de eosinófilos é o mesmo em homens e mulheres; ao contrário de relatos anteriores, acredita-se que não varia entre diferentes grupos étnicos. As altas contagens previamente relatadas em indianos e africanos são atribuíveis a influências ambientais.

O exercício vigoroso provoca aumento da contagem de eosinófilos, proporcionalmente ao aumento dos demais leucócitos.

As Tabelas 6.6, 6.7 e 6.8 mostram algumas causas de eosinofilia; as mais comuns são as doenças alérgicas (particularmente asma, febre do feno e eczema) e, em algumas partes do mundo, as parasitoses. Quando a contagem de eosinófilos é muito elevada (acima de $10 \times 10^3/\mu\text{L}$), o número de causas prováveis é bem menor (Tabela 6.9). As condições alérgicas que causam eosinofilia costumam ser identificadas à anamnese, mas, no caso das parasitoses, a detecção laboratorial da eosinofilia pode ser o achado que leva ao diagnóstico correto. Migrantes e viajantes que retornam de áreas tropicais devem fazer exames de fezes para ovos, cistos e parasitos e sorologia para *Schistosoma*, os que estiveram em zonas africanas onde há *Strongyloides haematobium* devem também pesquisá-lo em amostra terminal de urina.

Em pacientes hospitalizados, eosinofilia pode ser um sinal útil de alergia medicamentosa. Após transplante de medula óssea, a eosinofilia pode ser um aspecto da doença do enxerto *versus* hospedeiro, e parece ser preditiva de alterações esclerodérmicas extensas [166].

TABELA 6.7 Parasitoses que causam eosinofilia

Doenças	Parasitas	Grau usual de eosinofilia*
Protozooses		
Dientamebíase [95]	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Ausente ou leve [96]
Isosporíase [95]	<i>Isospora belli</i>	Ausente, em pacientes imunossuprimidos, ou leve [96]
Blastomicose [97]	<i>Blastocystis hominis</i>	
Miosite eosinofílica	<i>Sarcocystis hominis</i>	Raramente causa acentuada eosinofilia [98]
Giardiase	<i>Giardia lamblia</i>	Raramente causa acentuada eosinofilia [99]
Infestações por nematódeos		
Ancilostomose	<i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma ceylanicum</i> [100] <i>Ancylostoma caninum</i>	Ausente na infestação crônica, leve ou moderada durante o estágio de migração larval pelos pulmões (síndrome de Löffler) [96]
Larva migrans cutânea	<i>Ancylostoma braziliense</i> (ancilostomídeo do cão e do gato) [101] <i>Ancylostoma caninum</i> (ancilostomídeo do cão) [101] <i>Gnathostoma doloresi</i> [102]	Raramente associada com eosinofilia
Enterite eosinofílica epidêmica [103]	<i>Ancylostoma caninum</i>	
Ascariíase	<i>Ascaris lumbricoides</i> (lombriga)	Ausente durante o estágio adulto, moderada durante o estágio de migração larval pelos pulmões (síndrome de Löffler) [96]
Estrongiloidíase	<i>Strongyloides stercoralis</i> ("verme fio")†	Ausente, leve ou moderada; moderada durante o estágio de migração larval pelos pulmões (síndrome de Löffler) [96]; em geral, presente em hiperinfestação em pacientes imunossuprimidos
Tricuriase [101]	<i>Trichuris trichiura</i>	Ausente ou leve [96]
Triquinose [101]	<i>Trichinella spiralis</i>	Moderada ou acentuada durante a fase aguda [96]
Capilariase [101, 104, 105]	Infestação hepática por <i>Capillaria hepatica</i> (<i>Calodium hepaticum</i>), um nematódeo de roedores, ou infecção intestinal por <i>Capillaria philippinensis</i>	
Tricostrongilíase [101, 106]	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> (nematódeo de ovinos)	
Anisaquíase e pseudoterranovose [107]	<i>Anisakis simplex</i> e <i>Anisakis pregreffi</i> , <i>Contracaecum osculatum</i> e <i>Pseudoterranova decipiens</i> (vermes parasitos de peixes)	
Enterobiase	<i>Enterobius vermicularis</i> ("verme fio")†	Raramente causa eosinofilia, salvo quando há enterite [109]
Filariose (filariose linfática, incluindo eosinofilia pulmonar tropical resultante de filariose linfática oculta)	<i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia malayi</i> , <i>Brugia timori</i> (filárias de Bancroft, da Malásia e de Timor)	Leve, moderada ou acentuada; acentuada em eosinofilia pulmonar tropical [96]
Loíase [101]	<i>Loa loa</i> (verme ocular)	Moderada ou acentuada [96]
Oncocercose (cegueira do rio) [101]	<i>Onchocerca volvulus</i> (filária da cegueira)	Leve, moderada ou acentuada [96]
Mansonelose [101]	<i>Mansonella perstans</i>	
Dirofilariose (eosinofilia tropical, pneumonia eosinofílica)	<i>Dirofilaria immitis</i> (verme cardíaco do cão), <i>Dirofilaria repens</i> (nematódeo de cães, gatos e raposas) [109]	
Dracunculíase [101]	Infestação subcutânea por <i>Dracunculus medinensis</i> (verme da Guiné) Infestação por <i>Spirurina</i> tipo X [110]	

(continua)

TABELA 6.7 Parasitoses que causam eosinofilia (*Continuação*)

Doenças	Parasitas	Grau usual de eosinofilia*
Angiostrongiloidíase, meningite eosinofílica [111, 112]	<i>Angiostrongylus cantonensis</i> (nematódeo pulmonar do rato)	Leve ou moderada [96]
Enterite eosinofílica [101]	<i>Angiostrongylus costaricensis</i> (nematódeo do rato)	
Gnatostomíase [101] (incluindo meningite eosinofílica e <i>larva migrans</i> visceral)	<i>Gnathostoma spinigerum</i>	Leve, moderada ou acentuada [96]
<i>Larva migrans</i> visceral (incluindo toxocaríase, gnatostomíase, capilariase)	<i>Toxocara canis</i> ou <i>Toxocara cati</i> (toxocaríase) <i>Baylisascaris procyonis</i> [113] <i>Gnathostoma</i> spp. [113], por exemplo, <i>Gnathostoma doloresi</i> , <i>Gnathostoma spinigerum</i> ? <i>Ascaris suum</i> [113, 114], <i>Capillaria hepática</i> <i>Haycocknema perplexum</i> [115]	Moderada ou acentuada
Miosite eosinofílica (Tasmânia e Queensland)		Leve
Infestações por trematódeos		
Clonorquíase	<i>Clonorchis sinensis</i> (nematódeo hepático oriental ou chinês)	Ausente ou leve na infestação crônica, pode ser moderada ou acentuada na infestação aguda
Fasciolíase	<i>Fasciola hepatica</i> (nematódeo hepático de ovinos) [116] <i>Fasciola gigantica</i> [101] <i>Metsorchis conjunctus</i> (nematódeo hepático norte-americano) [117]	Leve, moderada ou acentuada durante o estágio de migração larval [96]
Fasciolopsíase	<i>Fasciolopsis buski</i> (grande nematódeo intestinal) [101, 106]	Acentuada
Heterofíase ou equinostomíase [101]	<i>Heterophyes heterophyes</i> ou <i>Echinostoma</i> spp. (nematódeos intestinais)	
Opistorquíase [101]	<i>Opisthorchis viverrini</i> (nematódeo hepático do Sudeste Asiático) ou <i>Opisthorchis felineus</i> (nematódeo hepático da Rússia, também encontrado na Itália)	Em geral, ausente ou leve, mas pode ser moderada ou acentuada na infestação recente
Paragonimíase, distomíase [101]	<i>Paragonimus westermani</i> (nematódeo pulmonar do oriente) [118]	Acentuada
Esquistossomose	<i>Schistosoma mansoni</i> <i>Schistosoma haematobium</i> <i>Schistosoma intercalatum</i> <i>Schistosoma mekongi</i>	Em geral, ausente ou leve, mas pode ser moderada ou acentuada na esquistossomose aguda (febre de Katayama) [96]
Infestações por cestódeos		
Cisticercose	Estágio larval da <i>Taenia solium</i> (platelminto do porco)	Ausente ou leve, pode ser moderada se morrerem larvas encistadas e liberarem antígeno [96]
Equinococose (cisto hidático)	Estágio larval do <i>Echinococcus granulosus</i> (platelminto do cão)	Ausente ou leve, pode aumentar se houver ruptura ou vazamento de cistos [96]
Cenurose [101]	<i>Coenurus cerebralis</i> (estágio larval de um platelminto do cão, <i>Taenia multiceps</i> , que raramente ocorre no homem)	
Himenolepsíase [101]	<i>Hymenoleps nana</i> (platelminto anão)	
Esparganose [101]	<i>Spirometra</i> ssp. p. exemplo, <i>Sparganum mansoni</i>	Ausente ou leve
Artrópodos		
Escabiose [85]	<i>Sarcoptes scabiei</i>	
Pentastomíase (endoparasito) [120]	<i>Armillifer moniliformis</i> , <i>Porocephalus taiwana</i> , <i>Armillifer agkistrodontis</i> (vermes da língua)	
Miíase [121]	Larvas cutâneas de moscas	

*Leve = 0,4 a 1,0 × 10³/μL; moderada = 1,0 a 3,0 × 10³/μL; acentuada = acima de 3,0 × 10³/μL.

†O termo “verme fio” (*threadworm*) é usado para dois parasitos diferentes.

TABELA 6.8 Algumas das causas menos comuns e raras de eosinofilia

<p>Eosinofilia hereditária [122]</p> <p>Leucemias mieloides, como a leucemia mieloide crônica e as variantes atípicas, mastocitose sistêmica e, menos frequentemente, outras neoplasias mieloproliferativas crônicas, leucemia mieloide aguda (particularmente as categorias FAB M2 e M4), leucemia eosinofílica crônica (incluindo a associada com <i>PDGFRB</i> ou <i>FGFR1</i> [124] ou com fusão <i>PCM1-JAK1</i> ou <i>ETV6-FLT3</i>)</p> <p>Distúrbios linfoproliferativos, como leucemia linfoblástica aguda (linhagens B e T e mista T-B) [125], linfomas não Hodgkin (particularmente os de células T, incluindo linfoma angioimunoblástico de células T [126], micose fungoide e síndrome de Sézary, linfoma de células T associado com enteropatia [127]), mieloma múltiplo [128], linfoma de Hodgkin</p> <p>Presença de um clone oculto de linfócitos T secretor de citocinas (como IL-3 e IL-5) capaz de aumentar a produção de eosinófilos [129]</p> <p>Síndrome linfoproliferativa autoimune [130] (raramente)</p> <p>Doenças malignas não hematológicas, como carcinoma, sarcoma, glioma, mesotelioma, melanoma, hepatoma, tumor hipofisário metastático [131]</p> <p>Distúrbios autoimunes e do tecido conectivo, como variante de Churg-Strauss de poliarterite nodosa (granulomatose eosinofílica com poliangites), vasculite necrosante sistêmica (variante da poliarterite nodosa), doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide (raramente) [98], dermatomiosite (raramente) [98], síndrome de Sjögren (raramente) [98], fascite eosinofílica (alguns casos causados por L-triptofano) [132], celulite eosinofílica (síndrome de Wells) [133], esclerose sistêmica progressiva [134], lúpus eritematoso sistêmico, hepatite crônica ativa [135], colangite esclerosante (raramente) [136], cirrose biliar primária (raramente) [98], hepatite autoimune [137], colangite eosinofílica [98], colecistite eosinofílica [98], cistite eosinofílica [138], pneumonia eosinofílica aguda (tardiamente na evolução) [139], pneumonia eosinofílica crônica, hemossiderose pulmonar idiopática [140], esofagite eosinofílica [98], enterite eosinofílica [98] (inclusive como manifestação de doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro, doença relacionada a IgG4 [141]</p>	<p>Administração de citocinas (como G-CSF [142], GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-5), que são capazes de aumentar a produção de eosinófilos, ou administração de citocinas (como IL-2 ou IL-15), que estimulam a produção de linfócitos T [143]</p> <p>Estados de imunodeficiência e outras condições com infecções recorrentes, como síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Job (síndrome de hiperimunoglobulina E), deficiência de IgA, síndrome de hiperimunoglobulina M, neutropenia congênita severa, infecção por HIV [144] (particularmente se complicada por infecção por HTLV-2 [129])</p> <p>Neutropenia cíclica</p> <p>Eosinofilia cíclica com angioedema [145]</p> <p>Miscelânea: recuperação de algumas infecções bacterianas e virais, primeiras semanas de vida de recém-nascidos prematuros, pneumonia por citomegalovírus na primeira infância [90], escarlatina, tuberculose (6-10% dos pacientes), coccidioidomicose, infecção por <i>Pneumocystis jirovecii</i>, histoplasmosse disseminada [146], doença do arranhão do gato [90], linfocitose infecciosa [90], infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> [147], administração de propranolol, abuso de drogas, incluindo inalação de cocaína [148, 149], síndrome do óleo tóxico [150], toxicidade por L-triptofano (ver anteriormente) [151], hemodiálise e, ocasionalmente, diálise peritoneal [90], doença ateroembólica [152, 153], doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro, síndrome de trombocitopenia com rádios ausentes (TAR), pancreatite crônica, síndrome de Omenn [154], vacinação contra hepatite B [155], tratamento de tumores linfóides com análogos de nucleosídeos (fludarabina ou cladribina) [156], hiperplasia angiolinfóide com eosinofilia, doença de Kimura [157], insuficiência suprarrenal (doença de Addison) [158] ou hipopituitarismo, toxicidade por arsênico [159], doença de Whipple [160], citopatia mitocondrial [161], hematoma subdural em organização [98], sarcoidose, pneumoconiose por metais pesados [162], infecção crônica ativa por vírus de Epstein-Barr [163], doença de Castleman [164], basidiobolomicose (infecção por <i>Basidiobolus ranarus</i>) [165]</p> <p>Desconhecida – síndrome hipereosinofílica idiopática [95]</p>
---	--

FAB, classificação franco-americano-britânica.

TABELA 6.9 Algumas causas de eosinofilia acentuada

<p>Infecções parasitárias, como toxocaríase, triquinose, migração tecidual de larvas de áscaris, de ancilóstomos ou de estrongilóides</p> <p>Hipersensibilidade medicamentosa</p> <p>Variante de Churg-Strauss da poliarterite nodosa</p> <p>Linfoma de Hodgkin</p> <p>Leucemia linfoblástica aguda</p> <p>Leucemia eosinofílica crônica</p> <p>Síndrome hipereosinofílica idiopática</p>

Deteção laboratorial de eosinofilia é importante em pacientes com doença pulmonar (Tabela 6.10), pois indica possibilidades diagnósticas relevantes e exclui condições, como a granulomatose de Wegener, que não se acompanham de eosinofilia. Em pacientes com sintomas de doença

obstrutiva das vias aéreas, a eosinofilia em geral indica a presença de um componente reversível ou asmático, embora não indique que os fatores desencadeantes sejam necessariamente alérgicos [173]. Na asma não complicada, a contagem de eosinófilos raramente excede $2 \times 10^3/\mu\text{L}$. Contagens mais altas, frequentemente associadas a deterioração de função pulmonar, podem indicar aspergilose alérgica ou síndrome de Churg-Strauss, a qual é uma variante da poliarterite nodosa, caracterizada pela presença de infiltrados pulmonares e eosinofilia, que não são típicos da poliarterite nodosa clássica [174]. Há pacientes que apresentam algumas características da poliarterite nodosa clássica e algumas da síndrome de Churg-Strauss; esse quadro é chamado de “vasculite necrosante crônica” ou “síndrome de sobreposição” (*overlap syndrome*); eosinofilia

TABELA 6.10 Algumas causas de eosinofilia com infiltração pulmonar

Infeções parasitárias, como toxocaríase, filariose, esquistossomose, estágio de migração de larvas em estrongiloidíase, ascaridíase, ancilostomíase
Asma
Aspergilose broncopulmonar alérgica
Reações de hipersensibilidade a drogas (como sulindaco, fenoprofeno, ibuprofeno, diclofenaco, tenidape [167], amoxicilina, claritromicina [168]) e agentes químicos (como zinco, cromo ou berílio)
Pneumonite por cocaína
Variante de Churg-Strauss da poliarterite nodosa e vasculite necrosante sistêmica
Infeções
Tuberculose (raramente), brucelose [169], coccidioidomicose (raramente), histoplasmose [169], pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> (raramente)
Sarcoidose [169]
Linfoma de Hodgkin [169]
Carcinoma [170]
Administração de citoquina (GM-CSF) [171]
Granulomatose broncocêntrica [172]
Pneumonia eosinofílica idiopática crônica
Síndrome hipereosinofílica idiopática

GM-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas e macrofágicas.

$> 1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ é um critério importante para o estabelecimento do diagnóstico dessas síndromes.

Em alguns pacientes com eosinofilia e infiltrado pulmonar, não se consegue encontrar uma condição subjacente clara; a maioria deles apresenta uma síndrome de causa desconhecida denominada pneumonia eosinofílica. A radiografia do tórax mostra um infiltrado periférico, e há uma resposta consistente à corticoterapia. A combinação do aspecto radiológico característico com a eosinofilia tem sido considerada suficiente para o diagnóstico [175], no entanto, em uma minoria de pacientes que não apresentam eosinofilia, há necessidade de biópsia pulmonar para estabelecer o diagnóstico.

Eosinofilia é uma rara manifestação de doença maligna não hematopoética. Quando ocorre, costuma tratar-se de doença maligna disseminada; raramente, pode ser uma pista para um tumor localizado. Eosinofilia pode ser mediada por interleuquina (IL)-3, IL-5, fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) ou fator estimulante de colônias as granulocíticemacrofágicas (GM-CSF), que às vezes demonstram serem secretadas pelas células tumorais [176, 177]. Eosinofilia também pode ocorrer como reação a doenças linfoides malignas, especialmente linfoma de Hodgkin, linfomas de linhagem T e leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linhagens

T ou B. Eosinofilia pode preceder outras evidências clínicas de linfoma ou LLA por 6-12 meses [178], e pode reaparecer algumas semanas antes de ser detectada recidiva. No linfoma de Hodgkin, uma eosinofilia isolada foi associada a melhor prognóstico [179]. Em alguns pacientes com eosinofilia inicialmente inexplicada pode, eventualmente, ser evidenciado um clone oculto de células T [180].

Em uma minoria dos casos, a eosinofilia é neoplásica, não reacional. Eosinofilia está presente em 90% dos casos de LMC e em uma porcentagem menor de outras leucemias mieloides e neoplasias mieloproliferativas. Ocorre, às vezes, na (LMA), mas raramente nas síndromes mielodisplásicas (SMDs). Em alguns pacientes com leucemia, predomina a diferenciação para eosinófilos; nesses casos, torna-se adequado o termo “leucemia eosinofílica crônica” (ver Capítulo 9).

Uma eosinofilia absoluta, ou mesmo relativa, pode ser útil no centro de tratamento intensivo para alertar o médico sobre a possibilidade de insuficiência suprarrenal. Foi sugerido que mais de 3% de eosinófilos, nesse setor, poderiam ser critério para investigação mais aprofundada [158, 181, 182].

Uma eosinofilia inexplicada em hemograma pode ocasionalmente ser preditiva de linfoma de Hodgkin (se eosinófilos $> 1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) ou de neoplasia mieloproliferativa (se eosinófilos forem, ao menos, $0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$); também foi notada em pacientes com (LLC) incipiente, previamente não diagnosticada; uma contagem de eosinófilos $> 0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ foi associada com um aumento de mortalidade global por todas as causas [183].

Resta citar um grupo de pacientes com eosinofilia persistente, moderada ou pronunciada, cuja causa não é encontrada apesar de investigação minuciosa. Essa condição é denominada “síndrome hipereosinofílica idiopática (SHE)” (ver Capítulo 9). Esse diagnóstico só pode ser aceito em paciente exaustivamente examinado em busca de causas identificáveis.

Basofilia

A Tabela 6.11 mostra algumas das causas de basofilia (leucocitose basofílica). A detecção de basofilia é útil na diferenciação entre neoplasias mieloproliferativas e condições reacionais, já que somente naquelas, e em algumas leucemias, é comum observar aumento acentuado da contagem de basófilos. Na LMC, o aumento da contagem de basófilos é importante para o prognóstico, pois frequentemente

TABELA 6.11 Algumas causas de basofilia

Distúrbios leucêmicos e mieloproliferativos
Leucemia mieloide crônica (quase sempre)
Outras leucemias mieloides crônicas
Leucemia mieloide aguda (muito raramente)
Policitemia vera
Trombocitemia essencial
Mielofibrose primária
Mastocitose sistêmica
Alguns casos de leucemias linfoblásticas agudas
Ph-positivas
Leucemia basofílica
Basofilia reacional
Mixedema (hipotireoidismo)
Colite ulcerativa
Artrite reumatoide juvenil [90]
Reações de hipersensibilidade imediata
Administração de estrogênio
Hiperlipidemia
Administração de IL-3 [73]
Linfoma [184]
De natureza desconhecida
Síndrome hipereosinofílica idiopática

indica fase acelerada da doença e transformação blástica iminente. Basofilia associada à LLA pode indicar que o paciente é Filadélfia-positivo, e basofilia na LMA pode indicar positividade para o cromossomo Filadélfia ou a presença da translocação t(6;9)(p23;q34.3); ambas as anormalidades cariotípicas indicam prognóstico adverso. A rara leucemia basofílica é frequentemente Filadélfia-positiva e, nesse caso, deve ser considerada como uma variante da LMC.

Linfocitose

É o aumento do número absoluto de linfócitos acima do que seria esperado em um indivíduo sadio da mesma idade. Uma vez que as contagens de linfócitos de lactentes e crianças são consideravelmente mais altas do que as dos adultos, é particularmente importante usar limites de referência adaptados à idade. A contagem de linfócitos não difere entre os sexos, nem entre diferentes grupos étnicos. Em adultos, uma contagem superior a $3,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ pode ser considerada anormal. A Tabela 6.12 mostra algumas causas de linfocitose. A linfocitose decorrente do exercício deve-se ao aumento de todas as populações linfocíticas: células B, células T CD4+ e CD8+, e células *natural killer* (NK) [215];

esse aumento é ampliado pela cafeína [216]. Estudos em pacientes esplenectomizados sugerem que dois terços do aumento de linfócitos T e NK devem-se à mobilização a partir do baço [217]. Em trabalhos feitos com análise multivariada, linfocitose mostrou-se preditiva de mortalidade em pacientes hospitalizados por trauma em geral ou dano ao sistema nervoso central [218].

Na avaliação da linfocitose, é importante considerar tanto a citologia como a contagem, devendo ambas serem avaliadas com relação à idade e aos aspectos clínicos do paciente. As crianças são mais propensas do que os adultos tanto à linfocitose quanto à alterações reacionais dos linfócitos, e até mesmo em crianças aparentemente saudáveis podem ser notados alguns linfócitos com atipias.

Pode ocorrer linfocitose sem alterações citológicas. Isso é o habitual quando resulta de redistribuição dos linfócitos (p. ex., após exercício ou injeção de adrenalina, ou como resposta aguda a estresse intenso), nas anormalidades endócrinas e na “linfocitose infecciosa aguda” (ver Tabela 6.12). Alterações citológicas também são incomuns na linfocitose da coqueluche, mas, às vezes, podem ser vistas células clivadas lembrando as do linfoma folicular [219]. Em outras infecções bacterianas e virais, são frequentes pequenas alterações dos linfócitos, como nucléolo visível ou ampliação do citoplasma basófilo, denominadas “alterações reacionais”. A mononucleose infecciosa e, em menor grau, outras condições associam-se a alterações reacionais bem mais pronunciadas, sendo as células anormais denominadas “linfócitos atípicos” ou “virócitos” (ver Tabela 9.1). A linfocitose pós-esplenectomia geralmente é leve, com atipias pouco significativas. É importante lembrar, entretanto, que há casos de linfocitose pós-esplenectomia com contagens que podem ultrapassar $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e levar, erroneamente, ao diagnóstico de um distúrbio linfoproliferativo; algumas vezes, há óbvio aumento de linfócitos grandes e granulados (LGGs). Muitos fumantes compulsivos apresentam moderada linfocitose, sem anormalidades citológicas; uma minoria, principalmente mulheres, apresenta linfocitose policlonal persistente de células B. Um aumento de LGGs pode ocorrer como uma alteração reacional, como na infecção pelo HIV [220], na hepatite B crônica e na infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), às vezes sem aumento da contagem global de linfócitos. Também pode haver linfocitose por aumento de LGGs após tratamento com desatinibe para LMC ou LLA Ph-positiva [221]; comprovou-se ser expansão de uma

TABELA 6.12 Algumas causas de linfocitose

Constitucionais	Administração de adrenalina (epinefrina)
Rearranjo defeituoso da integrina em resposta a quimioquinas e quimiotáticos, deficiência de quindlina 3 [51, 52]	Administração de plerixafor (antagonista de CXCR4) [79]
Síndrome de DiGeorge (pode ocorrer linfocitose B policlonal) [185]	Contração muscular vigorosa, como no exercício intenso e no estado de mal epilético
Linfocitose B policlonal, autossômica dominante, devida à mutação <i>CARD11</i> [186]	Tabagismo, causando linfocitose T (comum) ou linfocitose B policlonal persistente (rara) [204]
Adquiridas	Administração de citocinas, como a IL-3 [73] ou o G-CSF [205]
Infecções virais, incluindo sarampo, rubéola, caxumba, varicela, <i>influenza</i> , hepatite A, mononucleose infecciosa EBV, citomegalovirose, linfocitose infecciosa (infecção por alguns vírus <i>coxsackie</i> , adenovírus tipos 1, 2 e 5 e <i>ecovirus</i> 7) [187-191], infecções por HIV e pelos vírus linfotrópicos humanos HTLV-1 e HTLV-2 [192]	Reações alérgicas a drogas
Certas infecções bacterianas, incluindo coqueluche (infecção por <i>Bordetella pertussis</i>), brucelose, tuberculose, sífilis, peste (infecção por <i>Yersinia pestis</i>) [193], doença de Lyme [194], erliquiose monocítica humana (fase de recuperação) [195], anaplasmoze (antes dita erliquiose) granulocítica humana (fase de recuperação) [196], infecções por riquetsia, incluindo tifo rural (<i>Rickettsia tsutsugamushi</i> – agora denominada <i>Orientia tsutsugamushi</i>) e tifo murino (<i>Rickettsia typhi</i>) [197, 198], síndrome de choque tóxico [199] e infecções bacterianas em lactentes e crianças pequenas	Doença do soro
Malária [65], esplenomegalia malárica hiper-reativa [200] e a fase aguda da doença de Chagas [201]	Esplenectomia
Linfocitose transitória relacionada com o estresse, como a associada a infarto do miocárdio, parada cardíaca, trauma, complicações obstétricas e crise de anemia de células falciformes [202, 203]	Distúrbios endócrinos, como doença de Addison, hipopituitarismo, hipertireoidismo [206]
	β-Talassemia intermédia [207]
	Doença de Gaucher [208]
	Timoma [209]
	Síndrome linfoproliferativa autoimune [210]
	Associada com neutropenia autoimune induzida por rituximabe [211]
	Leucemias linfóides e outros distúrbios linfoproliferativos, como LLC, linfomas não Hodgkin linfoma, de Hodgkin (raramente) [212], leucemia/linfoma de células T do adulto, tricoleucemia e variante, macroglobulinemia de Waldenström, doença de cadeias pesadas, micose fungoide e síndrome de Sézary, leucemia de linfócitos grandes e granulados
	Tratamento com naltizumabe (anti-CD49b) [213]
	Tratamento com ibritinibe em LLC e linfoma de células do manto [214]

população monoclonal ou oligoclonal preexistente [222], de células T CD3+ e CD8+ ou de células NK CD3-CD16/CD56+.

Em distúrbios linfoproliferativos, a linfocitose origina-se geralmente da presença no sangue das células linfomatosas, que podem ser numerosas. Ocasionalmente também pode ocorrer, por exemplo, no linfoma de Hodgkin, uma linfocitose policlonal reacional associada ao linfoma [212]. Linfócitos neoplásicos quase sempre mostram anormalidades citológicas. A exceção é a LGGs, na qual as células neoplásicas costumam ser citologicamente indistinguíveis das respectivas células normais. Costuma-se dizer que na LLC há aumento de linfócitos maduros aparentemente normais, mas, na verdade, os linfócitos mostram anormalidades sutis. Os aspectos citológicos desse e de outros distúrbios linfoproliferativos são descritos no Capítulo 9. Em geral, os distúrbios linfoproliferativos têm aspectos citológicos característicos que

os distinguem facilmente das alterações reacionais dos linfócitos. Há exceções, como alguns linfomas de baixo grau, particularmente o linfoma de células do manto (*mantle cell lymphoma*), cujas células podem ser confundidas com linfócitos reacionais. Por esse motivo, o termo “alterações reacionais” deve ser usado com prudência.

Monocitose

É o aumento da contagem de monócitos acima da que seria esperada em um indivíduo sadio da mesma idade. O número absoluto de monócitos é mais elevado nos recém-nascidos do que nos demais períodos da vida. Na gravidez, ocorre um aumento paralelo ao aumento da contagem de neutrófilos. A Tabela 6.13 mostra algumas causas comuns de monocitose. Em casos de linfoma B de células grandes, uma contagem de monócitos acima de

$0,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ [238] ou de $0,63 \times 10^3/\mu\text{L}$ [239] associa-se a pior prognóstico. Monocitose acima de $0,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ em casos de linfoma de Hodgkin clássico [240] ou contagem de monócitos acima de $0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ em linfoma de Hodgkin nodular com predomínio linfocítico [241] têm significação prognóstica adversa; contagem de monócitos acima de $0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ em casos de linfoma de células do manto também tem significação adversa [242].

Ao examinar a distensão sanguínea de paciente com monocitose a esclarecer, devem ser procuradas evidências de infecção crônica ou mielodisplasia. A presença de promonócitos e de blastos sugere LMA com diferenciação monocítica.

TABELA 6.13 Algumas causas de monocitose [223]

Exercício
Caféina [216]
Infecções crônicas, incluindo tuberculose miliar [224], sífilis congênita [225], febre tifoide [226] e leishmaniose [227]
Febre maculosa das Montanhas Rochosas [90]
Malária [65] e babesiose [228]
Condições inflamatórias crônicas, incluindo doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico
Doença autoinflamatória devida à deficiência do antagonista do receptor de IL-1 [229]
Carcinoma [230]
Administração de citocinas, incluindo G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-10 e FLT- <i>ligand</i> [73, 231-233]
Administração de desmopressina [77]
Recuperação de supressão da medula óssea
Infarto do miocárdio [234]
Síndromes de neutropenia e imunodeficiência de várias causas, como neutropenia cíclica grave, neutropenia congênita, neutropenia idiopática crônica, neutropenia autoimune
Síndrome de Noonan em lactentes
Hemodiálise em longo prazo [235]
Administração de plerixafor (antagonista de CXCR4) [79]
Granulomatose linfomatoide [236]
Síndrome linfoproliferativa autoimune [237]
Distúrbio linfoproliferativo autoimune associado a RAS [237]
Neoplasias mieloides, incluindo leucemia mielomonocítica crônica, leucemia mieloide crônica atípica, leucemia mieloide crônica infantil, leucemia mielocítica crônica*, síndromes mielodisplásicas, mastocitose sistêmica, leucemia mieloide aguda
Linfoma difuso de células B grandes [238]
Tabagismo (cigarros) [84]

*Monocitose absoluta, mas não relativa.

Plasmocitose

É o aparecimento, no sangue, de número apreciável de plasmócitos, que podem ser reacionais ou neoplásicos. A Tabela 6.14 mostra algumas causas de plasmocitose.

Na plasmocitose reacional, o número de plasmócitos circulantes costuma ser baixo, mas, raramente, pode ser elevado. Em um caso de doença do soro causada por antitoxina tetânica, por exemplo, foram evidenciados $3,2 \times 10^3$ plasmócitos/ μL [243]. Em plasmocitoses reacionais, os plasmócitos são, em geral, maduros, mas podem ser vistos plasmoblastos ocasionais. Os plasmócitos podem conter vacúolos e, raramente, cristais. Também podem estar presentes linfócitos atípicos e linfócitos plasmocitoides, assim como haver alterações reacionais em células de outras linhagens.

Plasmócitos neoplásicos costumam mostrar anormalidades citológicas mais pronunciadas do que plasmócitos reacionais. Os aspectos hematológicos e o diagnóstico diferencial do mieloma múltiplo e da leucemia plasmocítica são discutidos no Capítulo 9.

TABELA 6.14 Algumas causas de plasmocitose no sangue periférico

Reacional
Infecções bacterianas e virais e imunizações
Reações de hipersensibilidade medicamentosa
Administração de estreptoquinase
Doença do soro
Lúpus eritematoso sistêmico
Neoplásica
Mieloma múltiplo e leucemia plasmocítica
Doença de cadeias pesadas- γ
Macroglobulinemia de Waldenström (raramente)
Linfoma angioimunoblástico de células T

Trombocitose

É o aumento da contagem de plaquetas acima da que seria esperada em um indivíduo sadio de mesmo sexo e idade. O uso do termo “trombocitemia” geralmente se restringe à trombocitose decorrente de uma neoplasia mieloproliferativa. Trombocitose resulta em geral de produção medular aumentada de plaquetas, tanto autônoma quanto reacional; após esplenectomia e no hipoesplenismo,

entretanto, a trombocitose resulta de redistribuição das plaquetas. A Tabela 6.15 mostra algumas causas de trombocitose, e a Tabela 6.16 destaca, dentre elas, as que causam grande aumento da contagem de plaquetas. Note-se que, com o uso generalizado de contadores automatizados que contam plaquetas como parte do hemograma, trombocitoses reacionais intensas em pacientes gravemente enfermos passaram a ser notadas na rotina diária. Esse aumento ocasionou baixa relativa de neoplasias mieloproliferativas como causa principal de trombocitoses acentuadamente elevadas; passaram a ser responsáveis, agora, por apenas 10 a 15% das contagens de plaquetas acima de 1 milhão/ μ L.

TABELA 6.15 Algumas causas de trombocitose

Primárias	Inflamação
Genéticas	Hemorragia
Trombocitose familiar (às vezes causada por mutação no gene <i>TPHO</i> , da trombopoetina, com herança autossômica dominante [244], às vezes sem relação com a trombopoetina e com herança dominante [245] ou recessiva, possivelmente ligada ao sexo [246], outras vezes decorrente de mutação no gene <i>MPL</i> [247]); polimorfismo de <i>MPL</i> (<i>MPL</i> -Baltimore) encontrado em 7% dos afro-americanos, causando trombocitose variável (às vezes acentuada) em heterozigotos e trombocitose acentuada em homozigotos [248]; em uma família, autossômica dominante devida à mutação <i>JAK2</i> V617I [249], em outra família devida à mutação <i>JAK2</i> R564Q [250]; hiperostose cortical infantil (mutação <i>COL1A1</i>) [251]; síndrome de Blackfan-Diamond [252]; alguns pacientes severamente anêmicos com síndrome de hipoplasia de cartilagens e pelos [253]	Cirurgia e trauma
	Doença maligna
	Doença de Kawasaki, com pico na segunda ou terceira semana [256]
	Deficiência de ferro
	Intoxicação por chumbo (um caso) [257]
	Rebote após quimioterapia citotóxica
	Rebote após parada de ingestão alcoólica
	Após tratamento de anemia megaloblástica severa
	Anemia hemolítica severa, particularmente após esplenectomia ineficaz
	Hiperplasia angiofolicular multicêntrica [258], doença de Castleman [259] e POEMS [259]
Adquiridas	Pneumonia eosinofílica crônica [260]
Trombocitemia essencial (todos os casos)	Administração de adrenalina (epinefrina)
Leucemia mieloide crônica (a maioria dos casos)	Administração de alcaloides da vinca, como a vincristina
Mielofibrose primária (no início do curso da doença)	Administração de trombopoetina recombinante ou PEG-rHuMGDF [261]
Policitemia vera (muitos casos)	Administração de IL-3 [73], IL-6 [262], IL-11 [263]
Síndromes mielodisplásicas (poucos casos na síndrome 5q-)	Administração de eritropoietina [264] ou vitamina E em prematuros [265]
Neoplasias mielodisplásicas-mieloproliferativas (alguns casos), como anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose	Em recém-nascidos de mães usuárias de drogas [266]
Leucemia mieloide aguda (raros casos, particularmente a leucemia megacarioblástica aguda, incluindo a mielopoese anormal transiente em recém-nascidos com síndrome de Down, alguns casos com inv(3)(q21q26) e durante tratamento de leucemia promielocítica aguda hipergranular com ácido transretinoico [254])	Doença de Erdheim-Chester [267]
	Doença de armazenamento de glicogênio tipo Ib [268]
	Neutropenia congênita severa [269]
	Reposição enzimática no tratamento de doença de Gaucher [270]
	Anorexia nervosa, especialmente (mas não só) durante realimentação [271]
Secundárias	Redistributiva
Exercício	Esplenectomia e hipoesplenismo
Cafeína [216]	Mecanismo desconhecido
Infeção (incluindo alguns pacientes com tuberculose miliar) [255]	Prematuros à idade de 4-6 semanas [272]
	Disgenesia plaquetária com produção cíclica

IL, interleucina; PEG-rHuMGDF, fator de crescimento e desenvolvimento megacariocítico humano recombinante peguilado; POEMS, Polineuropatia, Organomegalia, Endocrinopatia, proteína M, alterações cutâneas (*Skin changes*).

Hemograma

Aumento de tamanho das plaquetas, anisocitose plaquetária, presença de plaquetas pouco granuladas, núcleos circulantes de megacariócitos ou micromegacariócitos e contagem de basófilos aumentada são achados que sugerem doença medular primária, isto é, a trombocitose não é reacional. Plaquetas grandes também são vistas no hipoesplenismo, ao passo que, em trombocitoses reacionais, as plaquetas são em geral pequenas e normalmente granuladas. A distensão sanguínea também pode mostrar anormalidades das outras linhagens, que indicam o diagnóstico correto. Sinais de hipoesplenismo devem ser especificamente procurados.

TABELA 6.16 Algumas causas de contagens de plaquetas acentuadamente elevadas

Contagem de plaquetas	> 1 milhão/ μ L [273]	> 900 $\times 10^3$ / μ L [274]	> 1 milhão/ μ L [275]	> 500 $\times 10^3$ / μ L [276]
Número de pacientes	102	526	280	777
Causa	Casos correspondentes (%)			
Doença maligna	45	27	11,5	5,9
Esplenectomia e hipoesplenismo	40	20	16	1,9
Neoplasias mieloproliferativas	28	26	14	3,4
Infecção ou inflamação	30	19	26	35
Doença do tecido conectivo	2	9		
Deficiência de ferro	4			
Trauma ou outro dano tecidual			11,5	17,9
Perda de sangue			5	
Rebote			2,5	19,4

O nível de elevação da contagem de plaquetas é útil para o diagnóstico diferencial. Contagens acima de 1,5 milhão/ μ L são geralmente indicativas de síndrome mieloproliferativa, embora já tenham sido relatadas trombocitoses reacionais com contagens de 2 milhões/ μ L [275], e até mesmo de 6 milhões/ μ L [277]. Nas trombocitoses primárias, o contador automatizado pode mostrar um aumento do volume plaquetário médio (VPM) e da amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas (PDW), indicativos de tamanho plaquetário aumentado e anisocitose plaquetária, respectivamente. Na trombocitose secundária ou reacional, o VPM e o PDW costumam ser normais.

Exames adicionais

A causa de uma trombocitose reacional em geral é aparente na história clínica. Quando a causa não é aparente, são indicadas aspiração da medula óssea (mielograma), biópsia de medula para exame histológico, análise citogenética e testes de biologia molecular para mutações *JAK2* V617F e *CALR* (ver Capítulo 8). Entre as evidências indiretas de trombocitose reacional estão os aumentos de (VSG), proteína C-reativa, fibrinogênio, fator VIII e fator von Willebrand. Às vezes, é difícil distinguir deficiência de ferro com acentuada trombocitose reacional de policitemia vera complicada por deficiência de ferro; nesses, casos poderá ser necessária uma prova terapêutica com ferro, sob cuidadoso controle.

Anemia

É a redução da taxa de hemoglobina sanguínea, abaixo da esperada para um indivíduo sadio de mesma idade, sexo e estado fisiológico (gravidez ou não). Pode resultar de (i) produção defeituosa de

eritrócitos; (ii) redução da sobrevida eritrocitária na circulação, por hemólise ou perda sanguínea; (iii) retenção exagerada de eritrócitos, essencialmente normais, em um baço anormalmente grande; ou (iv) sequestração no baço – com menor frequência, no fígado –, de eritrócitos anormais, como os da anemia de células falciformes ou da hemoglobinopatia S/C. A anemia pode ser uma anormalidade isolada ou fazer parte de pancitopenia (ver adiante).

Hemograma

Um hemograma cuidadoso é fundamental para identificar a patogênese da anemia, mostrando microcitose, macrocitose ou algum tipo específico de pecilocitose. Eritropatias associadas a esses aspectos são discutidas no Capítulo 8. A presença de policromatofilia indica uma resposta adequada da medula óssea à anemia, sugerindo que a anemia possa ter sido causada por hemólise ou hemorragia. A Tabela 6.17 mostra, de forma resumida, o diagnóstico diferencial da anemia normocítica e normocrômica e os achados do sangue periférico de utilidade diagnóstica. Existem várias outras causas raras e curiosas de anemia, por exemplo, a anemia causada por tratamento com sanguessugas, que chegou, em um caso, até a exigir tratamento com transfusões [291]. A Tabela 6.18 especifica as causas de aplasia eritroide pura. Em alguns pacientes anêmicos, a microscopia mostra quadro leucoeritroblástico, isto é, estão presentes precursores granulocíticos e eritroblastos; nesses casos, o diagnóstico diferencial, mais limitado, é visto na Tabela 6.19. Uma distensão sanguínea com aspecto leucoeritroblástico é normal no período neonatal; nas gestantes, ocasionalmente, são vistos eritroblastos, mas precursores granulocíticos são comuns. Afora essas eventualidades, ou um

TABELA 6.17 Algumas causas de anemia normocítica normocrômica (excetuadas as que habitualmente causam pancitopenia, que estão na Tabela 6.30)

Condição causal	Alterações no hemograma e exames correlatos, úteis ao diagnóstico
Deficiência recente de ferro*	Alguns eritrócitos hipocrômicos, RDW aumentado
Anemia de doença crônica*	<i>Rouleaux</i> e VSG acelerada, às vezes trombocitose e/ou leucocitose, RDW geralmente normal
Intoxicação por chumbo*†	Pontilhado basófilo, policromatofilia em alguns casos
Deficiência simultânea de ferro e vitamina B ₁₂ ou ácido fólico*	Neutrófilos hipersegmentados, RDW aumentada
Perda de sangue	Em perda grande e súbita, a anemia é leucoeritoblástica; policromatofilia, reticulocitose e aumento da RDW surgem após alguns dias
Anemia hemolítica não esferocítica*	Alguns pecilócitos, policromatofilia, reticulocitose, RDW aumentado
Malária e babesiose	Parasitas presentes, às vezes trombocitopenia
Algumas anemias diseritropoéticas congênitas†	Anisocitose e pecilocitose acentuadas
Hemoglobinúria paroxística noturna	Às vezes, outras citopenias (particularmente leucopenia), baixa da fosfatase alcalina nos neutrófilos, policromatofilia em alguns casos
Síndromes mielodisplásicas†	Outros aspectos mielodisplásicos
Insuficiência renal	Às vezes, queratócitos ou esquizócitos
Insuficiência hepática†	Células em alvo, estomatócitos, acantócitos, outras citopenias
Insuficiência cardíaca congestiva	Nada
Hipotireoidismo†	Às vezes, acantócitos
Doença de Addison e hipopituitarismo	Linfocitose, eosinofilia, neutropenia, monocitopenia
Terapêutica de ablação androgênica para carcinoma de próstata	Nada
Hiperparatireoidismo	Nada
Anorexia nervosa	Outras citopenias, acantócitos, pecilocitose, pontilhado basófilo
Aplasia eritroide pura†	RDW normal, reticulocitopenia extrema
Síndrome de Pearson e outras citopatias mitocondriais*† [161, 278]	Nada
Cistinose	Nada
Administração de IL-2, IL-6 [279], IL-11 [280] ou IL-12 [281]	Outros aspectos da administração de citocinas
Tratamento com bortezumibe	Nada
Insuficiência autonômica [282] incluindo deficiência de dopamina-β-hidroxilase [283]	Nada
Intoxicação por vitamina D [284]	Nada
Hipervitaminose A [285]	Trombocitopenia concomitante
Intoxicação por arsênio	Pode haver pontilhado basófilo, neutropenia e trombocitopenia [286]
Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro [287]	Aspectos clínicos da doença
Tratamento com alentuzumabe (anti-CD52)	Nada
Tratamento com enalapril (inibidor da enzima conversora da angiotensina – ECA) [288]	Nada
Tratamento com sartanas, como losartana ou ibesartana, em pacientes com insuficiência renal ou em diálise [289]	Nada
Toxicidade da colchicina [290]	Vacuolização e alterações nucleares displásicas
Deficiência de cobre*†	Pode coexistir neutropenia
Síndrome de hipoplasia de cartilagens e cabelo†	Pode ocorrer trombocitose [253]

*Também pode ser microcítica.

†Também pode ser macrocítico(a).

TABELA 6.18 Algumas causas de aplasia eritroide pura

Transientes
Induzida por parvovírus B19
Causada por fármacos [292], como antibióticos, antitireóideos, anticonvulsivantes, azatioprina, tacrolimo [293], alopurinol [294], fenitoína, isoniazida, ribavirina [295]
Eritroblastopenia transitória da infância
Crônicas
Constitucionais
Síndrome de Blackfan-Diamond
Casos de hipoplasia de cartilagens e pelos com anemia severa [253]
Deficiência hereditária de transcobalamina [296]
Adquiridas
Associada à leucemia linfocítica crônica ou à leucemia de linfócitos grandes e granulados (T ou NK), à doença de Hodgkin, ao timoma ou à doença autoimune, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide ou síndrome poliglandular autoimune
Associada a tumor [297]
Associada à gravidez [298]
Infecção crônica pelo parvovírus B19 (em pacientes com imunidade deficiente)
Transplante de células-tronco de doador ABO incompatível [218], particularmente, mas não apenas, com condicionamento não mieloablativo [300]
Formação de anticorpos antieritropoetina após uso de eritropoetina recombinante [301]
Síndromes mielodisplásicas e outras neoplasias mieloides (p. ex., anemia refratária)

TABELA 6.19 Algumas causas de anemia leucoeritroblástica

Infiltração da medula óssea por carcinoma, linfomas, inclusive de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda ou outra doença maligna
Neoplasias mieloproliferativas, particularmente mielofibrose primária e leucemia mieloide crônica
Leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas
Granulomas da medula óssea, como na tuberculose miliar
Doenças metabólicas de armazenamento, como a doença de Gaucher
Hemólise aguda (incluindo a eritroblastose fetal)
Choque, como o causado por grande hemorragia
Infecção grave
Rebote após insuficiência ou supressão da medula óssea
Crise em anemia de células falciformes
Infarto da medula óssea
Talassemia maior
Anemia megaloblástica severa
Lúpus eritematoso sistêmico [302]
Raquitismo nutricional severo [303]
Osteopetrose

quadro de doença aguda, aspectos leucoeritroblásticos costumam indicar doença subjacente grave.

No período neonatal, as condições responsáveis por anemia diferem um pouco das que operam na vida ulterior (Tabela 6.20). Outras causas que, pela raridade, não estão na Tabela 6.20, incluem anemia associada com higroma cístico ou corioangioma e anemia resultante de hematúria fetal causada por

TABELA 6.20 Algumas causas de anemia, importantes no feto e no recém-nascido

Feto e recém-nascido
Anemias hemolíticas hereditárias severas: deficiência de G6PD (às vezes, após ingestão materna de oxidantes), deficiência de triosefosfato isomerase, deficiência de glicosefosfato isomerase, deficiência de piruvatoquinase [304], deficiência de hexoquinase [305], xerocitose hereditária [306], esferocitose homozigótica causada por proteína banda-3 Coimbra [307], homozigose para hemoglobina Taybe [308], ovalocitose* [309]
Hemoglobina F-Poole [310]
Hidropisia fetal da hemoglobina de Bart
Talassemia $\alpha\gamma\delta\beta$ [311]
Anemia diseritropoética congênita [312]
Síndrome de Blackfan-Diamond [313]
Hipotransferrinemia congênita [314]
Hemólise pela passagem transplacentária de aloanticorpos, como os anticorpos Rh ou Kell, raramente ABO [315]
Aplasia eritroide pura pela passagem transplacentária de anticorpos maternos anti-Kell ou anti-M [316]
Infecção por parvovírus B19
Infecção por citomegalovírus
Malária
Leucemia congênita [317]
Mielopoese anormal transiente da síndrome de Down
Hemorragia feto-materna (incluindo a decorrente de versão cefálica externa, amniocentese, hemorragia anteparto e trauma abdominal)
Hemorragia gêmeo-gemelar
Hemorragia resultante de amniocentese ou cordocentese
Recém-nascido
Hemorragia do cordão ou da placenta ou hemorragia interna (p. ex., céfalo-hematoma, hemorragia intracranial, ruptura de baço ou fígado) durante ou como decorrência de dificuldade no parto
Hemorragia gêmeo-gemelar durante o parto
Doença hemolítica do recém-nascido (p. ex., doença hemolítica por incompatibilidade ABO)
Hemólise grave transitória na eliptocitose hereditária
Hemólise associada à coagulação intravascular disseminada causada por sepse
Infecções congênitas, como rubéola, infecção por adenovírus [310]
Prematuridade
Deficiência de vitamina E [318]
Coleta de volumes inapropriadamente grandes de sangue para exame laboratorial (iatrogênese)

*Causa anemia hemolítica só no recém-nascido e no lactente.

nefroma mesoblástico congênito [310]. Ocasionalmente, recém-nascidos podem ser anêmicos em decorrência de hemoglobinopatia H, síndrome de Blackfan-Diamond, síndrome de Pearson, hipoplasia de cartilagens e cabelo, anemia sideroblástica congênita ou osteopetrose [310].

No feto e no recém-nascido, pode ocorrer anemia hemolítica pela passagem transplacentária de anticorpos (aloanticorpos ou, raramente, autoanticorpos maternos) ou de infecções intrauterinas por microrganismos que não costumam causar anemia em outros períodos da vida (p. ex., citomegalovirose, toxoplasmose, sífilis e rubéola) [319]. As consequências da anemia também diferem das encontradas em outros períodos da vida. Anemia severa no feto pode causar hidropisia fetal, condição caracterizada por edema acentuado do feto e da placenta e frequente óbito intrauterino. No recém-nascido, devido à imaturidade hepática, hemólise severa causa hiperbilirrubinemia extrema, com consequente dano cerebral. Portanto, a identificação de anemia, particularmente hemolítica, tem considerável importância no feto e no recém-nascido.

Exames adicionais

Quando a causa da anemia não é esclarecida pela história clínica e pelo hemograma, são necessários outros exames. Os que costumam ser mais úteis são (i) contagem de reticulócitos; (ii) dosagem de ferritina sérica ou de ferro sérico e capacidade ferropéxica; (iii) dosagens de vitamina B₁₂ sérica e de folato eritrocitário; e (iv) testes de função renal, tireoideia e hepática. Se essas investigações não revelarem a causa da anemia, costuma ser indicada uma aspiração da medula óssea. Quando há anemia leucoeritoblástica não esclarecida, na ausência de uma doença aguda, há imediata indicação de aspiração e biópsia da medula óssea.

No recém-nascido, podem ser úteis provas sorológicas na mãe e no bebê, um teste de Kleihauer para detectar hemorragia feto-materna, avaliação hematológica dos pais e dosagem de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

Reticulocitopenia

É a diminuição da contagem absoluta de reticulócitos abaixo da esperada para um indivíduo sadio da mesma idade. Em geral, a porcentagem de

reticulócitos também está diminuída. Para interpretar a contagem de reticulócitos, é importante não só considerar os limites de referência, mas também verificar se a contagem está condizente com o grau de anemia e com alguma diminuição da sobrevida eritrocitária, se houver. Assim, um paciente com anemia hemolítica deve ter uma contagem acima do limite de referência; a falta de reticulocitose, nesse paciente, pode indicar aplasia eritroide pura ou deficiência de ácido fólico. Causas de reticulocitopenia são listadas na Tabela 6.21.

TABELA 6.21 Algumas causas de reticulocitopenia

Deficiência de vitamina B ₁₂ , ácido fólico ou ferro
Anemia de doença crônica
Supressão da medula óssea por quimioterapia citotóxica ou outras drogas mielotóxicas
Anemia aplástica
Aplasia eritroide pura (extrema reticulocitopenia)
Leucemia aguda
Síndromes mielodisplásicas (a maioria dos casos)

Leucopenia

É a redução da contagem total de leucócitos abaixo da prevista para um indivíduo sadio de mesmo sexo, idade, estado fisiológico e origem étnica. Pode decorrer de diminuição do número de neutrófilos, do número de linfócitos, ou de ambos, portanto, não pode ser interpretada sem conhecimento da contagem diferencial. Há certas infecções associadas com leucopenia, em vez de leucocitose, de modo que a constatação de leucopenia em paciente febril pode ter utilidade diagnóstica. Entre as infecções leucopenizantes estão incluídas dengue, riquetsioses, febre tifoide e leishmaniose.

Neutropenia

É a redução da contagem absoluta de neutrófilos abaixo da prevista para um indivíduo de mesmo sexo, idade, estado fisiológico e origem étnica. No caso de indivíduos de etnia africana, é necessário usar limites de referência apropriados a fim de evitar um diagnóstico errôneo de neutropenia, uma vez que os africanos, em menor grau os afro-americanos e afro-caribenhos, têm contagens de neutrófilos bem mais baixas do que os brancos. A neutropenia pode

ser um achado isolado ou fazer parte de pancitopenia. Mecanismos de neutropenia incluem (i) produção inadequada pela medula óssea, decorrente de diminuição do número de células progenitoras, de substituição do tecido hematopoético ou de granulocitopose ineficaz; (ii) destruição pelos macrófagos da medula óssea e por outras células reticuloendoteliais nas síndromes hemofagocíticas; (iii) liberação medular defeituosa, como na rara mielocatexse; (iv) redistribuição dentro do sistema vascular, como ocorre no começo da hemodiálise e pode suceder por sequestração pulmonar subsequente a transfusão de sangue contendo um anticorpo anti-neutrófilos, por exemplo, no dano pulmonar agudo relacionado a transfusão [320]; (v) retenção no baço; (vi) sobrevida intravascular encurtada, como

nas neutropenias imunes; e (vii) rápido egresso para os tecidos, quando a liberação medular não consegue aumentar proporcionalmente, como nos recém-nascidos com sepse.

Um achado inesperado de neutropenia à contagem automatizada deve ser sempre confirmado pelo exame de distensão sanguínea, uma vez que a neutropenia pode ser espúria (ver Capítulo 4). A detecção laboratorial de neutropenia inesperada pode ter importância vital, pois a agranulocitose induzida por drogas é grave, às vezes rapidamente fatal. Em muitos casos, a causa provável será facilmente notada à história clínica do paciente, incluindo o uso de drogas. Quando a história e o hemograma não revelarem a causa, costuma ser necessário exame da medula óssea. As Tabelas 6.22 e 6.23 resumem as causas de neutropenia.

TABELA 6.22 Alguns distúrbios hereditários que causam neutropenia

<p>Agenesia ou disgenesia reticular (granulocitopenia acentuada, monocitopenia e linfocitopenia, com hipoplasia do timo e dos linfonodos e imunidade celular e humoral deficientes; devida à mutação bialélica no gene <i>AK2</i>)</p> <p>Neutropenia com deficiência exócrina pancreática e discondroplasia – a neutropenia pode ser intermitente (síndrome de Shwachman ou Shwachman-Diamond, resultante de mutações no gene <i>SBD5</i>)</p> <p>Distúrbios mitocondriais: neutropenia com deficiência exócrina pancreática e eritropose sideroblástica (síndrome de Pearson) [278], síndrome de Barth (miocardiopatia, retardo de crescimento e, variavelmente, neutropenia congênita que pode ser cíclica, resultante de mutação do gene <i>TAZ</i> (G4.5) em Xq28) [321], síndrome de Kearns-Sayre [161], deficiência de fumarase [161]</p> <p>Neutropenia familiar benigna</p> <p>Neutropenia familiar severa, antes designada agranulocitose genética infantil (autossômica recessiva, autossômica dominante ou ligada ao sexo – casos autossômicos recessivos conhecidos com síndrome de Kostmann), alguns casos decorrem de mutações no gene <i>ELANE</i> (elastase) ou no gene <i>HAX1</i>; em menor número de casos, decorre de mutação no gene que codifica o receptor de G-CSF [322], ativando mutações do gene <i>WAS</i> [323, 324] ou gene <i>GFI1</i> [325]; mutação (autossômica recessiva) no gene <i>LAMTOR2</i> (<i>MAPBPIP</i>) [326]; um ou dois casos relatados de mutação <i>BLOC156</i> que codifica palidina, síndrome de Hermansky-Pudlak tipo 9 (autossômica recessiva) [327]</p> <p>Neutropenia cíclica familiar (autossômica dominante) [328]; pode resultar de mutação do gene <i>ELANE</i></p> <p>Neutropenia disgranulopoética congênita [329]</p> <p>Mielocatexse, também designada síndrome WHIM (verrugas [Warts], Hipogamaglobulinemia, Infecções e Mielocatexse) [330]</p>	<p>Síndrome do leucócito preguiçoso (pode, na verdade, representar neutropenia autoimune infantil, não hereditária) [90]</p> <p>Síndrome de Chédiak-Higashi</p> <p>Disqueratose congênita</p> <p>Associada à agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (um terço dos casos)</p> <p>Associada à síndrome de hiperimunoglobulina M [331]</p> <p>Associada à hipoplasia de cartilagens e cabelo</p> <p>Associada à imunodeficiência grave combinada [332]</p> <p>Síndrome de Cohen [333]</p> <p>Síndrome de Bloom [334]</p> <p>Síndrome de Blackfan-Diamond, durante o curso da doença [335]</p> <p>Síndrome de Griscelli, tipo 2 [336]</p> <p>Síndrome de Hermansky-Pudlak, devida à mutação do gene <i>AP3B1</i> (síndrome de Hermansky-Pudlak, tipo 2) [337]</p> <p>Associada a sítio frágil familiar em 16q22, causando deleção em mosaico del(16)(q22) [338]</p> <p>Deficiência de glutatíon sintase [90]</p> <p>Síndrome de Rothmund-Thomson [339]</p> <p>Associada a certos erros inatos do metabolismo: hiperglicemia idiopática, acidemia isovalérica, acidemia metilmalônica, doença do armazenamento de glicogênio tipo Ib devida a mutação bialélica <i>SLC37A4</i>, mutação bialélica <i>G6PC3</i> [340], deficiência de carnitina [341], acidúria metilglutacônica [342], acidemia propiônica [343], hiperzincemia com hipercalprotectinemia [344], tirosinemia [90], deficiência de mevalonato quinase (síndrome de hiperimunoglobulina D) [345]</p>
---	---

G-CSF, fator estimulante de colônias granulocíticas.

TABELA 6.23 Alguns distúrbios adquiridos que causam neutropenia

Infecções	Neutropenia imunológica
Infecções virais, como sarampo, caxumba, rubéola (incluindo infecção intrauterina) [346], vacina tripla (sarampo-cachumba-rubéola), <i>influenza</i> , <i>influenza</i> aviária A [347], vacinação para <i>influenza</i> [348], hepatite infecciosa, mononucleose infecciosa, citomegalovirose (incluindo infecção intrauterina) [346], infecção por herpes-vírus humano 6 [349, 350], infecção por parvovírus B19 (ocasionalmente) [351], febre amarela, dengue, febre do carrapato do Colorado, febre hemorrágica da Venezuela [352], febre hemorrágica da Crimeia e do Congo [353], infecção por vírus da coriomeningite linfocítica [354], síndrome respiratório agudo grave (SARS) decorrente de infecção por coronavírus (ocasionalmente) [355], infecção por HIV em estágio avançado (aids), virose com febre alta e trombocitopenia (causada por um bunivírus) [356], infecção por vírus Heartland (um flebovírus) [357], hepatite C crônica [358]	Neutropenia aloimune, secundária à transfusão [377] ou (em recém-nascidos) causada por passagem transplacentária de aloanticorpo materno a antígenos neutrofílicos, antígenos HLA ou CD16 (FcγRIIIb; um caso) [378]
Infecções bacterianas, como febre tifoide e paratifoide, brucelose, tularemia [359], alguns casos de tuberculose miliar [223], no início de algumas infecções por gram-negativos, infecção bacteriana avassaladora (particularmente, mas não apenas, por gram-negativos), infecção bacteriana em recém-nascidos, infecções por riquetsia, incluindo tifo rural [360], riquetsia varicelosa [361], infecção por riquetsia <i>africae</i> [362] e alguns casos de tifo exantemático, anaplasmoose granulocítica (antes denominada erliquiose granulocítica humana) e erliquiose monocítica humana [363]	Neutropenia imunológica em recém-nascidos, causada por passagem transplacentária de autoanticorpos maternos [379]
Infecção por protozoários, como malária, calazar, tripanossomíase, babesiose [364]	Neutropenia autoimune [380], incluindo neutropenia autoimune isolada e neutropenia autoimune associada a anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide (síndrome de Felty), escleroderma, hipertireoidismo, hepatite crônica ativa, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, timoma, linfoma de Hodgkin e demais linfomas, linfoma angioimunoblástico de células T, leucemia de linfócitos grandes e granulados (T e NK) e aumento de linfócitos T ativados [381], infecções virais (infecção crônica por parvovírus [382], infecção por HIV, mononucleose infecciosa), doença de Castleman, síndrome de Sjögren, manosiidose, hipogamaglobulinemia
Infecções fúngicas, como histoplasmose [365]	Panleucopenia autoimune [383]
Fármacos,* como agentes alquilantes, outros agentes antineoplásicos e fármacos correlatos (incluindo metotrexato usado no tratamento de doenças reumáticas e dermatológicas), azatioprina, zidovudina (raramente em lactentes por exposição perinatal [367]), reação idiossincrásica a fármacos (mais comum com fármacos antitireoideos, sulfonamidas, clorpromazina, ouro), interferon, alentuzumabe, rituximabe (provavelmente autoimune) [368], bortezumibe [369], sirolimo, imatinibe [370], fostamatatinibe (R788) [371], talidomida, ledalidomida, pomalidomida, levamisol,* etanercepte, clopidogrel, brodalumabe [372], ixequizumabe [373], G-CSF (transiente, cerca de 30 minutos após administração) [374], ibrutinibe [375]	Aplasia leucocitária pura autoimune [384] (pode estar associada a timoma)
Exposição a gás de mostarda [376]	Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro [287]
Administração de IL-12 [281]	Administração de anti-Rh no tratamento de púrpura trombocitopênica autoimune [385]
Irradiação	Imunodeficiência severa combinada, possivelmente devida à doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro induzida por linfócitos T maternos [386]
Substituição da medula óssea, como em leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiplo ou carcinoma metastático	Neutropenia cíclica, incluindo a neutropenia cíclica que acomete o adulto, associada à leucemia de linfócitos grandes e granulados (ver anteriormente)
Mielofibrose primária e secundária	Hemodiálise e leucóferese por filtração (no início dos procedimentos)
Granulocitopose ineficaz, como na maioria dos casos de leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas	Dano pulmonar agudo associado à transfusão (TRALI) [320, 387]
Anemia megaloblástica	Aférese de células-tronco no sangue periférico [388]
Anemia aplástica	Distúrbios endócrinos, como hipopituitarismo, doença de Addison e hipertireoidismo [206]
Hemoglobinúria paroxística noturna	Alcooolismo [389]
Anafilaxia aguda	Anorexia nervosa [271]
Hiperesplenismo	Doença de Kawasaki
Síndromes hemofagocíticas	Doença de Kikuchi (linfonodite necrosante) [390]
	Deficiência de cobre [391, 392]
	Intoxicação por arsênio [286]
	Hipercarotenemia [393]
	Insuficiência placentária – bebês com retardo de crescimento intrauterino e bebês de mães hipertensas e diabéticas [394, 395]
	Bebês com <i>asfixia</i> perinatal [395]
	Doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade Rh [394]
	Oxigenação com membrana extracorpórea em recém-nascidos [396]
	Administração de eritropoetina a bebês prematuros [264]
	Associada à eritroblastopenia transitória da infância [397]
	Infusão de imunoglobulina intravenosa em lactentes [394]
	Tratamento com alentuzumabe [398]
	Sarcoidose esplênica [399]
	Neutropenia grave intermitente de mecanismo incerto em alguns pacientes com deficiência imunológica devida à mutação <i>STK4</i> [400]

*Pode resultar de uso inadvertido do fármaco, como no caso de levamisol empregado como aditivo à cocaína [366].

Eosinopenia

É a redução da contagem de eosinófilos abaixo da prevista para um indivíduo sadio da mesma idade. Eosinopenia raramente é notada na distensão sanguínea de rotina, pois não pode ser detectada à contagem diferencial convencional de 100 leucócitos, uma vez que o eosinófilo é uma célula de baixa porcentagem, e os limites de referência incluem o zero. Desde a introdução das contagens diferenciais automatizadas, a eosinopenia é notada com frequência bem maior, mas, por tratar-se de uma anormalidade inespecífica comum, a detecção não tem grande importância clínica.

Durante a gravidez, ocorre uma baixa fisiológica na contagem de eosinófilos, e há nova queda durante o trabalho de parto. A Tabela 6.24 mostra as causas comuns. Há relato de eosinopenia na síndrome de Down [401]. Entre as causas raras de eosinopenia estão incluídos timoma, aplasia eosinofílica pura [402] e aparente destruição autoimune de eosinófilos e basófilos [403]. Há diminuição dos eosinófilos nos portadores do vírus linfotrópico humano 1 (HTLV-1) [404].

TABELA 6.24 Algumas causas de eosinopenia

Estresse agudo, incluindo trauma, cirurgia, queimaduras, convulsões epileptiformes, infecções agudas, inflamação aguda, infarto do miocárdio, anoxia e exposição ao frio
Síndrome de Cushing
Fármacos, incluindo corticoides, ACTH, adrenalina e outros β-agonistas, histamina e aminofilina
Hemodiálise (durante o procedimento)

Basopenia

É a redução da contagem de basófilos abaixo da prevista para um indivíduo sadio. Algumas causas são apresentadas na Tabela 6.25. Os basófilos são tão escassos no sangue normal que sua redução não é notada ao exame da distensão, à contagem diferencial de rotina de 100 leucócitos e mesmo à contagem diferencial de 500 leucócitos. Em teoria, pode ser detectada à contagem diferencial feita em contadores automatizados, pois nestes os limites de referência para os basófilos não incluem o zero. Na prática, entretanto, a contagem eletrônica de basófilos não costuma ser exata, e o dado, até o momento, parece carecer de importância diagnóstica.

TABELA 6.25 Algumas causas de basopenia

Estresse agudo, incluindo infecção e hemorragia
Síndrome de Cushing e administração de ACTH
Administração de prednisona em indivíduos sadios [405]
Anafilaxia, urticária aguda e outras reações alérgicas agudas
Urticária crônica (aumentada por tratamento com prednisolona) [405]
Hipertireoidismo
Administração de progesterona

Monocitopenia

É a redução da contagem de monócitos abaixo da esperada para indivíduos saudáveis da mesma idade. Pode acompanhar outras citopenias, como na agenesia reticular e na anemia aplástica. Monocitopenia autossômica dominante e esporádica pode estar associada a uma mutação com perda de função de *GATA2*, junto com redução de linfócitos B, células NK e células dendríticas, e predispor a síndromes mielodisplásicas e LMA (síndrome MonoMAC) [406, 407]. Também pode haver monocitopenia associada com neutrocitopenia congênita moderada devida à mutação *GATA2* [408]. Há ausência de monócitos circulantes na homozigose para uma rara mutação no gene que codifica o fator regulatório 8 do interferon [409]. A contagem de monócitos está diminuída na síndrome WHIM (verrugas [Warts], Hipogamaglobulinemia, Infecções, Mielocatexes) [79]. A contagem de monócitos cai após administração de corticosteroides e em infecções agudas associadas à endotoxemia [90]. O número de monócitos está consideravelmente diminuído na leucemia de células pilosas. A contagem de monócitos cai, junto com a de neutrófilos, no dano pulmonar agudo associado à transfusão (TRALI) [387]. Tratamento com alentuzumabe causa monocitopenia.

Linfocitopenia (ou linfopenia)

É a redução da contagem de linfócitos abaixo da prevista para um indivíduo sadio da mesma idade. Para comprová-la em bebês sob suspeita de imunodeficiência, é importante o uso de valores de referência apropriados; contagens abaixo de $2,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ em bebês com infecção levantam a possibilidade de imunodeficiência combinada severa [410].

TABELA 6.26 Algumas causas de linfocitopenia

Hereditárias Algumas raras síndromes de imunodeficiência congênita, incluindo disgênese reticular, imunodeficiência combinada severa, agamaglobulinemia do tipo suíço, alguns casos de hipoplasia do timo (síndrome de diGeorge), ataxia telangiectasia, mutação no gene CD2 [415], síndrome WHIM [79] Anemia diseritropoética congênita do tipo I [416]	Transplante de células-tronco* Tratamento com clozapina [86] Hipersensibilidade à quinidina [418] Tratamento com eritropoetina [419] Administração de IL-12 [281] Vacinação contra a <i>influenza</i> [420] Irradiação Alcoolismo [389] Artrite reumatoide [421] e lúpus eritematoso sistêmico [422] Sarcoidose [423] Anemia aplástica e agranulocitose Anemia megaloblástica Síndromes mielodisplásicas [424, 425] [†] Anorexia nervosa [426] Linfangiectasia intestinal e doença de Whipple Aférese de células primitivas periféricas [388] Anemia ferropênica [427] Aférese plaquetária crônica [428] Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro* Administração de “óleo de Lorenzo” [429] Timoma [430]
Adquiridas Estresse agudo, incluindo trauma, cirurgia, queimaduras, infecção aguda, insuficiência hepática fulminante (pode ser precedida por linfocitose) Insuficiência renal aguda e crônica (incluindo pacientes em diálise) Síndrome de Cushing e administração de corticoides ou ACTH Carcinoma (particularmente na doença avançada) Alguns linfomas, inclusive o linfoma de Hodgkin (particularmente na doença avançada) Linfoma angioimunoblástico de células T Infecção aguda por HIV e aids Terapia citotóxica e imunossupressora, particularmente com uso de análogos de nucleosídeos, e com globulina antilinfocítica, antitumórica e anticorpos monoclonais direcionados a linfócitos (p. ex., alemtuzumabe – anti-CD52); dimetilfumarato (para psoríase) [417]	

*Uma contagem de linfócitos < 0,75 × 10³/μL no dia +100 é preditivo de grave e extensa doença do enxerto *versus* hospedeiro após transplante alogênico.

[†]Uma contagem de linfócitos < 1,2 × 10³/μL é de significação prognóstica adversa nas síndromes mielodisplásicas [452].

Linfocitopenia é muito comum como parte da resposta aguda ao estresse, embora seja frequentemente obscurecida pelas alterações neutrofilicas coexistentes. Sua detecção só é segura quando se faz uma contagem diferencial automatizada, a qual deve ser sempre interpretada em valores absolutos. Com a crescente importância do diagnóstico da aids, caracterizada por linfopenia, cuja severidade acentua-se com a progressão da doença, é importante levar em consideração o quanto a linfocitopenia é comum em pacientes agudamente enfermos, independentemente da natureza da doença subjacente: em um levantamento em pacientes com bacteriemia, linfopenia foi um achado mais constante do que neutrofilia [411]. No linfoma de Hodgkin, uma contagem de linfócitos abaixo de 0,6 × 10³/μL tem implicações prognósticas adversas [412]; também é de significação adversa em linfoma de células T periféricas (sem outra especificação) [413]. Da mesma forma, em linfoma difuso de células B grandes, uma contagem de linfócitos < 1,0 × 10³/μL à apresentação associa-se a pior prognóstico [414], e linfopenia ao fim do tratamento de primeira linha

é preditiva de recaída precoce [414]. Contagens de linfócitos, 3-6 dias após exposição à irradiação, correlacionam-se com a gravidade da doença de irradiação aguda, variando de 0,8 a 1,5 × 10³/μL durante este período nos casos de doença leve a 0,01 × 10³/μL, sem fase latente, nos casos com exposição letal [431].

Causas de linfocitopenia são resumidas na Tabela 6.26.

Trombocitopenia (ou plaquetopenia)

É a redução da contagem de plaquetas abaixo do nível esperado em um indivíduo sadio de mesmo sexo e idade. A origem étnica também deve ser considerada, pois têm sido observadas contagens mais baixas em africanos e afro-caribenhos. Trombocitopenia pode ser congênita ou adquirida e resultar de redução da produção ou de aumento da destruição, de consumo ou de perda extravascular. As causas estão resumidas na Tabela 6.27.

TABELA 6.27 Algumas causas de trombocitopenia (excluindo condições em que geralmente há pancitopenia)

Insuficiência da produção de plaquetas	
<i>Congênicas (herdadas ou resultantes de eventos intrauterinos)</i>	
Anomalia de May-Hegglin, síndromes de Sebastian, Epstein e Fechtner (todas resultantes de uma mutação MYH9)	
Síndrome de Bernard-Soulier	
Outras trombocitopenias hereditárias (ver Tabelas 8.11- 8.13)	
Hipoplasia megacariocítica herdada ou decorrente de eventos intrauterinos (incluindo algumas mutações do gene <i>MPL</i> que codifica o receptor de trombopoetina), alguns casos de síndromes de trissomias 13, 18 e 21, trombocitopenia com rádios ausentes (TAR), trombocitopenia com sinostose radioulnar (mutação <i>HOXA11</i>), trombocitopenia com rádios normais, mas com outras anomalias físicas em 40% dos casos, com genética autossômica recessiva ou recessiva ligada ao sexo [432], trombocitopenia amegacariocítica com síndrome de Noonan [433], trombocitopenia ligada ao sexo devida à mutação <i>GATA1</i>	
Agenesia reticular (trombocitopenia variável)	
Insuficiência placentária – associada a hipoxia fetal/retardo de crescimento intrauterino/bebês de mães hipertensas ou diabéticas [394, 434]	
Doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade Rh e, particularmente, Kell [435, 436]	
Passagem transplacentária de anticorpos antiplaquetas maternos inibindo a megacariocitopoeia, por exemplo, anti-HPA-2b [437]	
<i>Hereditária, mas ausente ao nascimento</i>	
Anemia de Fanconi	
<i>Adquiridas</i>	
Após dano à medula óssea, provocado por algumas das drogas que podem causar anemia aplástica, ou como primeira manifestação de anemia aplástica, ou como um aspecto de exposição ao gás de mostarda [438]	
Fármacos antineoplásicos – agentes alquilantes, nitrosureias, antraciclinas, mitoxantrona, imatinibe (raramente) [196], desatinibe [439], talidomida, lenalidomida, bortezomibe	
Administração de tiazida	
Síndromes mielodisplásicas	
Deficiência severa de ferro (raramente)	
Infecção por parvovírus (raramente) [440]	
Infecção por herpes-vírus humano 6 [350], incluindo retardo na pega megacariocítica após transplante alogênico com infecção recente pela variante B do vírus [441]	
Infecção crônica pelo vírus da hepatite C (provavelmente) [442]	
Tratamento com interferon	
Hemoglobinúria paroxística noturna	
Abuso de álcool [443]	
Anorexia nervosa [271]	
Trombocitopenia autoimune amegacariocítica adquirida [443], incluindo trombocitopenia amegacariocítica associada com leucemia de linfócitos grandes e granulados e, às vezes, causando trombocitopenia cíclica [444]	
Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro [287]	
Insuficiência renal crônica sob hemodiálise e, em menor grau, sob diálise peritoneal [445]	
Desenvolvimento de anticorpos à trombopoetina após administração de trombopoetina recombinante peguilaada [446]	
Hipervitaminose A [285]	
Deficiência de cobre [392]	
Intoxicação por arsênico [286]	
Aumento de consumo, destruição ou remoção de plaquetas (demonstrados ou presuntivos)	
Mecanismos imunológicos	
<i>Congênitos</i>	
Trombocitopenia aloimune	
Transferência transplacentária de autoanticorpos maternos	
Transferência transplacentária de anti-GpIIb/IIIa (em um caso de mãe com trombostenia de Glanzmann) [447]	
Transferência transplacentária de isoanticorpos anti-CD36 de mães deficientes em CD36 [448]	
Transferência transplacentária de anticorpos HLA maternos (rara) [437]	
Transferência transplacentária de anticorpos ABO maternos (rara) [437]	
Hipersensibilidade medicamentosa materna	
<i>Adquiridos</i>	
Púrpura trombocitopênica autoimune, como uma anormalidade isolada ou associada a outra doença autoimune (lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolípido primário, artrite reumatoide, anemia hemolítica autoimune – síndrome de Evans –, síndrome linfoproliferativa autoimune), com uma doença linfoproliferativa (leucemia linfocítica crônica, linfomas, incluindo de Hodgkin, leucemia de linfócitos grandes e granulados), com sarcoidose [448], imunodeficiência comum variável [449] ou linfoma angioimunoblástico de células T	
Aloimune, por exemplo, causada por transferência de linfócitos do doador durante transplante de células-tronco [450], infusão de plasma contendo aloanticorpos antiplaquetas [451]	
Trombocitopenia imunológica induzida por drogas, incluindo trombocitopenia induzida por heparina, trombocitopenia induzida por protamina-heparina [452], trombocitopenia induzida por quinino (incluindo água tônica, <i>bitter</i> limão e Dubonnet de [453], vancomicina e carbimazol [454] e trombocitopenia induzida por anticorpos monoclonais antiplaquetas, como abciximabe* (antiglicoproteína plaquetária IIb/IIIa) [455] e outros fármacos que interferem na ligação do fibrinogênio às glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa – eptifibatida, orbofibana, roxifibana, tirofibana e xemilofibana [456], alentuzumabe (a trombocitopenia é transiente)	

(continua)

TABELA 6.27 Algumas causas de trombocitopenia (excluindo condições em que geralmente há pancitopenia) (Continuação)

<p>Trombocitopenia autoimune induzida por fármacos, como sais de ouro e provavelmente procainamida, sulfonamidas e interferons α e β [457]</p> <p>Trombocitopenia imunológica associada a alimentos, como creme de gergelim (<i>tahine</i>) [458], grãos de <i>Lupinus termis</i> [459], leite de vaca [453], suco de oxicoço (<i>cranberry</i>) [453], chá herbáceo Jui (medicina tradicional chinesa) [460]</p> <p>Trombocitopenia imunológica associada a infecções por HIV, citomegalovírus, [461], herpes-vírus humano 6 [462], [463], vírus da hepatite E HCV [464] <i>Mycoplasma pneumoniae</i> [465], escarlatina (infecção por estreptococo β-hemolítico) [466], tuberculose [467, 468], brucelose [469], toxoplasmose [469], infecção por <i>Helicobacter pylori</i> [470], febre Q [471], vírus da influenza aviária H7N9 [472], malária, babesiose</p> <p>Trombocitopenia pós-infecção, particularmente após rubéola, mas também após varicela, mononucleose infecciosa e outras infecções virais e vacinações, como a vacina tríplice</p> <p>Púrpura pós-transfusional</p> <p>Abuso de cocaína [473]</p> <p>Anafilaxia</p> <p>Oníaloi [474] (tipo africano de púrpura trombocitopênica aguda)</p> <p>Uso de dialisadores esterilizados com radiação com feixe de elétrons [475]</p>	<p>a Hantaan, Seoul, Puumala e outros vírus e síndrome pulmonar por hantavírus devida ao vírus Sin Nombre) [59], infecção por Black Creek Canal e outros vírus, infecção causando síndrome viral com febre elevada e trombocitopenia (SFTSV) [356], infecções por Filoviridae (febres hemorrágicas por vírus Marburg e ebolavírus), infecções por Flaviviridae (febre amarela [487], dengue, doença de Kyasanur Forest e febre hemorrágica de Omsk) e algumas outras infecções virais, como febre do carrapato do Colorado (infecção por coltivirus), infecção por HIV aguda, infecção por vírus do vale Cache [488], infecção por vírus da coriomeningite linfocítica [354], encefalite por vírus Nipah [489], síndrome de insuficiência respiratória aguda severa (SARS) associada a coronavírus [354], infecção por <i>influenza</i> aviária A [347], febre chikungunya [490], infecção por vírus Heartland (um febovírus) [357], infecção pelo vírus do oeste do Nilo [491], infecção por vírus Alkhumra [492]</p> <p>Infecções por riquetsia, por exemplo, febre macular das Montanhas Rochosas, febre macular maligna do Mediterrâneo, tifo por carrapatos de Queensland [493], tifo rural [494], tifo murino [495]</p> <p>Certas infecções bacterianas, por exemplo, febre hemorrágica brasileira (infecção por <i>Haemophilus aegypticus</i>), febre recorrente (infecção por <i>Borrelia recurrentis</i>), erliquiose humana monocítica (infecção por <i>Ehrlichia chaffeensis</i>), anaplasmoze humana granulocítica (infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>, antes designada erliquiose humana granulocítica) e infecções por <i>Ehrlichia ewingii</i> e erliquias Wisconsin [496], <i>Bartonella quintana</i> (febre das trincheiras) [497], antraz contaminado por inalação [498], brucelose [499], febre tifoide [500], leptospirose [501]</p> <p>Certas protozooses, como malária e babesiose</p> <p>Circulação extracorpórea</p> <p>Uso de balão inflável intra-aórtico [502]</p> <p>Aférese de células-tronco periféricas [388]</p> <p>Transfusão maciça</p> <p>Sarcoma de Kaposi [503]</p> <p>Sarcoma histiocítico do baço [504]</p> <p>Administração de fator estimulante de colônias macrofágicas (M-CSF) [505]</p> <p>Picada de ofídio [83]</p> <p>Envenenamento por picadas de abelhas [506]</p> <p>Fitosterolemia adquirida associada com nutrição parenteral com base em soja [507]</p>
<p>Mecanismos não imunológicos</p> <p><i>Congênitos</i></p> <p>Síndrome de Shulman-Upshaw [476, 477] (deficiência de ADAMTS13)</p> <p>Fitosterolemia hereditária [478]</p> <p>Hemangioendotelioma kaposiforme [479] ou hemangioma gigante (síndrome de Kasabach-Merritt)</p> <p>Hemangioma intra-hepático infantil [479]</p> <p>Doença de von Willebrand tipo IIb, particularmente após tratamento com desmopressina, e pseudodoença de von Willebrand tipo plaquetário (defeito genético de Gplb plaquetária)</p> <p>Mutação no gene <i>ITGB3</i> que codifica Gpllb/IIa [480]</p> <p><i>Adquiridos</i></p> <p>Coagulação intravascular disseminada (incluindo associada a intermação, administração de IL-2 [481, 482], tripanossomíase [483] e angiossarcoma [484])</p> <p>Microangiopatia trombótica (púrpura trombocitopênica trombótica e condições correlatas, ver Tabela 8.8)</p> <p>Doença venoclusiva pós-transplante de fígado [485]</p> <p>Tromboembolismo venoso [486]</p> <p>Febres hemorrágicas virais – infecção por arenavírus (febre de Lassa e febres hemorrágicas argentina, boliviana, venezuelana e brasileira), infecções por bunivírus (febre do Rift Valley, febre hemorrágica da Crimeia e do Congo, febre hemorrágica com síndrome renal devida</p>	<p>Redistribuição das plaquetas</p> <p><i>Congênita</i></p> <p>Hiperesplenismo</p> <p><i>Adquiridas</i></p> <p>Hiperesplenismo (incluindo sequestração aguda na anemia de células falciformes)</p> <p>Administração de óleo de Lorenzo [429, 508]</p> <p>Hipotermia [509]</p>

(continua)

TABELA 6.27 Algumas causas de trombocitopenia (excluindo condições em que geralmente há pancitopenia) (*Continuação*)

Mecanismos incertos ou complexos	Adquiridos
<i>Congênitos</i>	
Prematuridade extrema	Fototerapia no recém-nascido [518]
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Síndrome de dificuldade respiratória e ventilação mecânica no recém-nascido [519, 520]
Síndrome das plaquetas cinzentas	Herpes simples neonatal
Anomalia de Chédiak-Higashi	Associada à cardiopatia cianótica congênita
Síndrome de Griscelli tipo 2 [469]	Hipertireoidismo neonatal [521]
Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo II [510]	Tuberculose miliar [255]
Trombocitopenia cíclica e disgenesia plaquetária com produção cíclica	Doença de Graves [522]
Macrotrombocitose do Mediterrâneo	Hipertireoidismo [523]
Síndrome de Jacobsen (trombocitopenia de Paris-Trousseau, deleção terminal de 11q, com <i>breakpoint</i> q21-q24)	Trombocitopenia associada à gravidez
Infecções congênicas (toxoplasmose, citomegalovirose, rubéola, sífilis, listeriose, infecção por vírus <i>coxsackie</i> B e herpes simples, febre recorrente [infecção por <i>Borrelia hermsii</i>] [511])	Doença de Monge (poliglobulia inapropriada relacionada à altitude) [524]
Associada a certos erros inatos do metabolismo (hiperglicinemia idiopática [512], acidemia metilmalônica [512], acidemia isovalérica [512], acidemia propiônica [343], hiperzincemia com hipercalprotectinemina [344], deficiência de holocarboxilase sintetase, acidúria mevalônica [513])	Trombocitopenia com exantema em recém-nascidos japoneses [525]
Citopatias mitocondriais, incluindo síndrome de Pearson, deficiência de fumarase e síndrome de depleção mitocondrial [161, 514]	Doença de Wilson [526]
Associada a fator plaquetário V Quebec [515]	Superdosagem de paracetamol [527]
Anemia diseritropoética congênita tipo I (a trombocitopenia é transitória) [516]	Induzida por fármacos, não imune: valproato, anrirona, linezolida [457, 528]
Neutropenia congênita severa durante tratamento com G-CSF [517]	Induzida por fármacos, mecanismo desconhecido: infliximabe, efalizumabe, rituximabe [457, 529, 530], alentuzumabe, omalizumabe (anti-imunoglobulina E) [531], trastuzumabe [532], bortezomibe [369], IL-12 [281], sirolimos, ibrutinibe [375]
	Meio de contraste radiológico iodado [457]
	Uso de chá herbáceo Jui (medicina tradicional chinesa) (provavelmente imunológica) [533]
	Febre de Oroya [191]

* Notar que abcximabe também causa falsa trombocitopenia por estimular agregação plaquetária.

Informações sobre drogas que causa de trombocitopenia podem ser obtidas em um *website* atualizado anualmente [534].

A contagem de plaquetas é significativamente mais baixa e o VPM é significativamente mais alto em pacientes com síndromes coronárias agudas em comparação com pacientes com angina estável ou dor de origem não cardiológica [535].

Algumas causas de trombocitopenia particularmente importantes no feto e no recém-nascido estão nas Tabelas 6.28 e 6.29. Em fetos com retardo de crescimento intrauterino, a trombocitopenia é sinal de pior prognóstico [537]. Trombocitopenia aloimune é a causa mais comum de trombocitopenia acentuada em recém-nascidos.

Hemograma

Em trombocitopenias congênicas a esclarecer, devem ser avaliadas as dimensões e a granularidade das plaquetas e a morfologia leucocitária: em várias condições hereditárias, há trombocitopenia associada com anormalidades morfológicas de plaquetas

ou neutrófilos (ver Capítulo 9). Em trombocitopenias adquiridas, o tamanho das plaquetas também é relevante, pois excesso de destruição ou consumo plaquetários periféricos, com aumento de liberação da medula, associa-se com aumento de volume plaquetário, ao passo que insuficiência da produção medular associa-se com plaquetas de tamanho normal ou diminuído. A série vermelha deve ser igualmente examinada em busca de evidências de hemólise microangiopática, que costuma associar-se à trombocitopenia pelo componente trombótico. Devem ser também pesquisadas a presença de anormalidades linfocíticas sugestivas de viroses ou distúrbios linfoproliferativos, de blastos, granulócitos imaturos e eritroblastos (indicativos de leucemia ou infiltração da medula óssea) e alterações displásicas (indicativas de mielodisplasia ou LMA). Crianças com trombocitopenia amegacariocítica podem ter macrocitose [433].

A contagem automatizada mostra VPM e PDW aumentados quando há aumento de consumo ou de destruição plaquetária, e VPM baixo quando há

TABELA 6.28 Algumas causas de trombocitopenia fetal (plaquetas < 150 × 10³/μL) [536, 537]; a prevalência nos fetos com as anomalias especificadas é mostrada entre parênteses [536]

Categoria/mecanismo	Frequência entre casos de trombocitopenia	Causa e % de casos em cada condição em que foi notada
Infecção intrauterina	28%	Toxoplasmose (26%), citomegalovirose (36%), rubéola (20%), infecção por HIV
Imunológica	18%	Trombocitopenia aloimune, trombocitopenia autoimune materna
Anormalidades cromossômicas	17%	Trissomia 13 (54%), trissomia 18 (86%), trissomia 21 (6%), síndrome de Turner (31%), triploidia (3/4)
Mecanismos desconhecidos e provavelmente heterogêneos	12%	Associada com múltiplas anomalias congênicas, sem anormalidades cromossômicas
Retardo de crescimento intrauterino	6%	Doença hemolítica Rh grave
Mecanismo desconhecido	4%	Síndrome de Wiskott-Aldrich
Herdada	Rara	Trombocitopenia amegacariocítica congênita

TABELA 6.29 Algumas causas de trombocitopenia de particular importância no recém-nascido (para mecanismos e outras causas raras, ver Tabela 6.27)

Hipoxia fetal crônica (hipertensão materna, diabetes melito, retardo idiopático de crescimento intrauterino)*
Asfixia perinatal (muitas vezes associada com coagulação intravascular disseminada) [538]
Infecção intrauterina
Infecções virais (citomegalovirose, rubéola, infecção por HIV, herpes simples, varicela-zóster, coxsackie B)
Sífilis congênita
Listeriose
Toxoplasmose congênita
Infecção perinatal (p. ex., <i>Escherichia coli</i> , estreptococos do grupo B) [538]
Anticorpos antiplaquetas maternos (autoanticorpos, aloanticorpos ou anticorpos dependentes de drogas)
Leucemia congênita, incluindo a mielopoese anormal transitória da síndrome de Down
Coagulação intravascular disseminada (resultando de sepse, asfixia aguda, síndrome de angústia respiratória, hipertensão pulmonar, enterocolite necrosante) [272]
Trombose (da aorta ou veia renal) [537]
Síndrome de Kasabach-Merritt
Herdadas (p. ex., trombocitopenia com rádios ausentes, trombocitopenia amegacariocítica congênita, trissomia 13 [538], trissomia 18 [538], síndrome de Noonan [539])
Doença metabólica (p. ex., acidemias propiônica e metilmalônica, doença de Gaucher) [536]
Exsanguinotransusão
Hiperbilirrubinemia e fototerapia [272]
Hipotermia induzida [537]
Enterocolite necrosante

*Podem estar associados poliglobulia, leve neutropenia e aspectos de hipoesplenismo [537].

insuficiência de produção e liberação da medula óssea. A contagem de “plaquetas reticuladas” eleva-se quando há *turnover* plaquetário aumentado e diminui quando há falta de produção.

Outros exames

Em trombocitopenias congênicas, o paciente deve ser examinado em busca de defeitos congênicos associados e outros membros da família, quanto ao número e à morfologia das plaquetas, com vistas a detectar outras evidências de anormalidades herdadas. Crianças com trombocitopenia amegacariocítica podem ter aumento da porcentagem de hemoglobina F e aumento de expressão de antígeno i [433].

Em trombocitopenias adquiridas, que não sejam prontamente explicadas pelas circunstâncias clínicas, podem ser úteis o exame por aspiração da medula óssea e testes para a detecção de anticorpos (fator antinuclear, anti-DNA e anticoagulante lúpico), além de testes de coagulação, para excluir coagulação intravascular disseminada. Também devem ser feitos testes para anticorpos anti-HIV.

Pancitopenia

É uma combinação de anemia (com baixa contagem de eritrócitos), leucopenia e trombocitopenia. A leucopenia costuma dever-se à diminuição dos neutrófilos, embora o número dos demais leucócitos frequentemente também esteja diminuído.

Pancitopenia em geral é causada por substituição ou insuficiência da medula óssea, mas às vezes deve-se à retenção de células em um baço

aumentado, ou à destruição periférica de células maduras. Pancitopenia cíclica, provavelmente induzida por citoquinas, é uma rara manifestação do linfoma de Hodgkin [540]. Algumas causas de pancitopenia estão na Tabela 6.30. Na prática médica hospitalar, pancitopenia geralmente se deve a tratamentos citotóxicos ou imunossupressores.

TABELA 6.30 Algumas causas de pancitopenia

<p>Distúrbios hereditários</p> <p>Condições hereditárias que causam anemia aplástica: anemia de Fanconi, disceratose congênita, síndrome WT de hipoplasia radioulnar, anemia hipoplástica e suscetibilidade para leucemia [541], xeroderma pigmentosa, estágios tardios da síndrome de Shwachman-Diamond, anemia aplástica subsequente à trombocitopenia amegacariocítica congênita [432], incluindo alguns pacientes com trombocitopenia amegacariocítica resultante de um receptor de trombopoetina defeituoso (mutação <i>MPL</i>) [542], síndrome de ataxia-pancitopenia [543], síndrome de Jacobsen (deleção terminal de 11q com <i>breakpoint</i> q21-q24), síndrome de Dubowitz (microcefalia e outros defeitos de desenvolvimento com anemia aplástica) [433], síndrome de Seckel (microcefalia e nanismo, com anemia aplástica) [433]</p> <p>Osteopetrose</p> <p>Defeitos metabólicos, hereditários [544-548]: manosidose, doença de Gaucher, doença de Niemann-Pick do adulto, acidúria metilmalônica, oxalose, acidemia isovalérica, acidúria α-metil β-hidroxibutírica, acidemia propiônica, cistinose</p> <p>Citopatias mitocondriais, incluindo alguns casos da síndrome de Pearson [278] e pancitopenia associada com encefalopatia necrosante [549]</p> <p>Outras condições hereditárias raras: deficiência de cobalamina C [550], síndrome de Griscelli tipo 2 [551], anemia responsiva à tiamina [552], síndrome de Wolfram (ou síndrome DIDMOAD – Diabetes Insípido Diabetes Melito, Atrofia óptica [<i>Optic Atrophy</i>], Surdez [<i>Deafness</i>]), acidúria metilmalônica</p> <p>Distúrbios adquiridos</p> <p>Anemias aplásticas e hipoplásticas (idiopática, induzida por vírus, induzida por drogas e agentes químicos, hipopituitarismo [553]); aplasia da medula óssea antecedendo a LLA; aplasia da medula óssea associada a timoma e leucemia de linfócitos grandes e granulados; doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro, inclusive pós-transfusional; infusão de linfócitos do doador após transplante de células-tronco hematopoéticas; irradiação; uso de agentes alquilantes e de outras fármacos antineoplásicos e fármacos correlatos; tratamento com imatinibe [554]; alentuzumabe; desenvolvimento de anticorpos antitrombopoetina [555]</p> <p>Infiltração da medula óssea, com ou sem fibrose associada, incluindo LLA, LMA (hematopoese ineficaz também contribui), mieloma múltiplo, carcinoma, linfomas, <i>hairy cell leukemia</i> e variante</p>	<p>Linfoma de Hodgkin (induzido por citoquinas) [540]</p> <p>Distúrbios clonais da hematopoese: síndromes mielodisplásicas, hemoglobinúria paroxística noturna, mielofibrose aguda, mielofibrose primária avançada</p> <p>Hematopoese ineficaz: anemia megaloblástica aguda ou severa</p> <p>Intoxicação por arsênico [556]</p> <p>Infecções agudas: alguns casos de infecção aguda por HIV [557], parvovírus [558], erliquiose [559] e anaplasmo [560], brucelose [561], tuberculose miliar, citomegalovirose em receptores de transplante de medula óssea [562], infecção por herpes-vírus humano 6 [563], infecção por herpes-vírus humano 8 em pacientes imunossuprimidos [564], toxoplasmose em pacientes imunossuprimidos [565], pneumonia dos Legionários [566], febre macular do Mediterrâneo [567], infecção crônica ativa por vírus de Epstein-Barr (EBV) [568] e na evolução de infecção por EBV em pacientes com a síndrome linfoproliferativa ligada ao sexo</p> <p>Algumas infecções crônicas, especialmente calazar (nesse caso, deve-se a hipersplenismo), infecção crônica por parvovírus (raramente) [569], tuberculose miliar (poucos pacientes) [255]</p> <p>Síndromes hemofagocíticas, incluindo familiar e relacionada a infecção</p> <p>Aids</p> <p>Fusariose [570]</p> <p>Lúpus eritematoso sistêmico</p> <p>Imunocitopenia combinada [571]</p> <p>Síndrome linfoproliferativa autoimune [572]</p> <p>Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro crônica ou grave [573]</p> <p>Pancitopenia imunológica induzida por fármacos (como a causada por fenacetina, ácido paraminossalicílico, sulfonamidas, rifampicina e quinina)</p> <p>Hipersplenismo (p. ex., calazar e esquistossomose mansônica)</p> <p>Doença do histiócito azul-marinho durante nutrição parenteral prolongada (provavelmente por hipersplenismo) [574]</p> <p>Doença de Wilson [575]</p> <p>Hipertireoidismo (raramente) [576]</p> <p>Toxicidade alcoólica [389]</p> <p>Deficiência de cobre [576]</p> <p>Hipotermia [577]</p> <p>Doença de Paget [578]</p> <p>Hiperparatireoidismo [579]</p>
--	---

Hemograma

Quando a etiologia não é óbvia pela história, a dis-tensão sanguínea deverá ser cuidadosamente exa-minada à procura de blastos, aspectos displásicos nas três séries, células linfomatosas, células pilosas, células de mieloma, exagero de *rouleaux*, macróci-tos, neutrófilos hipersegmentados, eritroblastos e

granulócitos imaturos. Blastos devem ser especificamente procurados ao longo dos bordos da distensão; a presença de blastos e *hairy cells*, mesmo quando em número reduzido, tem valor diagnóstico. Na anemia aplástica, os eritrócitos podem ser normocíticos ou macrocíticos, não há policromatocitose e as plaquetas são pequenas e de tamanho uniforme; ocasionalmente, há pecilocitose acentuada.

Diagnóstico diferencial

A presença de aspectos displásicos, excluindo-se pacientes sob quimioterapia, sugere infecção por HIV, síndrome mielodisplásica (SMD) ou LMA. Macrocytose pode ser vista em hepatopatias, abuso alcoólico, anemia megaloblástica, anemias aplástica e hipoplástica, SMD e após quimioterapia citotóxica. Pecilocitose e reação leucoeritroblástica (ver Tabela 6.19) sugerem infiltração da medula ou mielofibrose primária. Reticulocitopenia indica baixa produção de eritrócitos, enquanto reticulocitose sugere destruição periférica, como na hemoglobinúria paroxística noturna ou nas destruições celulares autoimunes.

O eritrograma pode mostrar aumento do VCM e do RDW. VPM e contagem de plaquetas reticuladas apropriadamente elevados sugerem destruição plaquetária periférica, enquanto diminuição de ambos apesar de haver trombocitopenia sugere falta de produção medular.

Exames adicionais

A contagem de reticulócitos é sempre indicada, e o mielograma, geralmente necessário. Não se obtendo um material celular à aspiração, a biópsia da medula óssea é mandatória. A aspiração deve ser urgente se houver suspeita clínica de síndrome hemofagocítica, de infecção aguda ou de anemia megaloblástica de rápida instalação. Nesta última eventualidade, pode ainda não haver macrócitos, nem neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico, e o diagnóstico será possível apenas pelo mielograma. A indicação de outros exames decorrerá dos resultados destes e dos diagnósticos aventados.

Referências

- 1 Doubek M, Brychtova Y, Tomiska M and Mayer J (2005) Idiopathic systemic capillary leak syndrome misdiagnosed and treated as polycythemia vera. *Acta Haematol*, **113**, 150–151.
- 2 Endo Y, Torii R, Yamazaki F, Sagawa S, Yamauchi K, Tsutsui Y *et al.* (2001) Water drinking causes a biphasic change in blood composition in humans. *Pflügers Arch*, **442**, 362–368.
- 3 Juvonen E, Ikkala E, Fyhrquist F and Ruutu T (1991) Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood*, **78**, 3066–3069.
- 4 Prchal JT and Sokol L (1996) “Benign erythrocytosis” and other familial and congenital polycythemas. *Eur J Haematol*, **57**, 263–268.
- 5 Ang SO, Chan H, Stockton DW, Sergueeva A, Gordeuk WF, Prchal JT (2001) Von Hippel-Lindau protein, Chuvash polycythemia and oxygen sensing. *Blood*, **98**, 748a.
- 6 Percy MJ, McMullin MF, Jowitt SN, Potter M, Treacy M, Watson WH and Lappin TRJ (2003) Chuvash-type congenital polycythemia in 4 families of Asian and Western European ancestry. *Blood*, **102**, 1097–1099.
- 7 Perrotta S, Nobili B, Ferraro M, Migliaccio C, Borriello A, Cucciolla V *et al.* (2006) Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood*, **107**, 514–519.
- 8 Tomasic NL, Piterkova L, Huff C, Bilic E, Yoon D, Miasnikova GY *et al.* (2013) The phenotype of polycythemia due to Croatian homozygous *VHL* (571C>G:H191D) mutation is different from that of Chuvash polycythemia (*VHL* 598C>T:R200W). *Haematologica*, **98**, 560–567.
- 9 Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison CN, Lappin TRJ, Maxwell PH *et al.* (2006) A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 654–659.
- 10 Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF and Lee FS (2008) A gain-of-function mutation in the *HIF2A* gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med*, **358**, 162–168.
- 11 Distelhorst CW, Wagner DS, Goldwasser E and Adamson JW (1981) Autosomal dominant familial erythrocytosis due to anomalous erythropoietin production. *Blood*, **58**, 1155–1158.
- 12 Manglani MV, DeGross CG, Dukes PP and Ettinger LJ (1998) Congenital erythrocytosis with elevated erythropoietin level: an incorrectly set “erythrostat”? *J Pediatr Hematol Oncol*, **20**, 560–562.
- 13 Guan Y, Wu JK, Jastaniah W, Moss LG, Digman C, Mostacci S *et al.* (2004) A new polycythemia syndrome: congenital polycythemia with high erythropoietin and propensity for malignant hypertension due to paraganglioma. *Blood*, **104**, 171b.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



- 14 Tanaka KR and Zerez CR (1990) Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. *Semin Hematol*, **27**, 165–185.
- 15 King AJ, Eyre T and Littlewood T (2013) Obstructive sleep apnoea and erythrocytosis. *Brit Med J*, **347**, 24–25.
- 16 Hutchinson DCS, Sapru RP, Sumerling MD, Donaldson GWK and Richmond J (1968) Cirrhosis, cyanosis and polycythemia: multiple pulmonary arteriovenous anastomoses. *Am J Med*, **45**, 139–151.
- 17 Gajra A and Grethlein SJ (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia 2: an unusual cause of polycythemia in pregnancy. *Blood*, **94**, Suppl. 1, 14b.
- 18 di Marco AT (1989) Carbon monoxide poisoning presenting as polycythemia. *N Engl J Med*, **319**, 874.
- 19 Bonadies N, Tichelli A and Rovo A (2012) When water doesn't clear the smut from the smoke: secondary polyglobulia caused by accidental co-intoxication related to excessive water-pipe smoking. *Haematologica*, **97**, Suppl. 1, 703.
- 20 Hammond D and Winnick S (1974) Paraneoplastic erythrocytosis and ectopic erythropoietins. *Ann N Y Acad Sci*, **230**, 219–227.
- 21 Souid AK, Dubanshy AS, Richman P and Sadowitz PD (1993) Polycythemia: a review article and a case report of erythrocytosis secondary to Wilms' tumor. *Pediatr Hematol Oncol*, **10**, 215–221.
- 22 Bazari H, Attar EC, Dahl DM, Uppot RN and Colvin RB (2010) Case 23-2010: a 49-year-old man with erythrocytosis, perinephric fluid collections, and renal failure. *N Engl J Med*, **363**, 463–475.
- 23 Shaheen M, Hilgarth KA, Antony AC, Hawes D and Badve S (2003) A Mexican man with "too much blood". *Lancet*, **362**, 806.
- 24 Eccersley LRC, Moule SP, Kargathra N, Abrahamson G, Philpott N, Baynes K and Brito-Babapulle F (2007) Hyperparathyroidism 2 associated polycythemia: an analysis of 140 cases of hyperparathyroidism. *Br J Haematol*, **137**, Suppl. 1, 49.
- 25 Bank H and Passwell J (1974) Absolute erythrocytosis in early infectious hepatitis. *Med Chir Dig*, **3**, 321–323.
- 26 Jacobs P and Wood L (1994) Recurrent benign erythropoietin-secreting pheochromocytomas. *Am J Med*, **97**, 307–308.
- 27 Reynen K (1995) Cardiac myxomas. *N Engl J Med*, **333**, 1610–1617.
- 28 Nagajothi N and Sanmugarajah J (2006) Erythrocytosis and gestational hyperandrogenism. *Am J Hematol*, **81**, 984–985.
- 29 Dickerman RD, Pertusi R, Miller J and Zachariah NY (1999) Androgen-induced erythrocytosis: is it erythropoietin? *Am J Hematol*, **61**, 154–155.
- 30 Sykes DB, Schroyens W and O'Connell CO (2011) The TEMPI syndrome 2: a novel multisystem disease. *N Engl J Med*, **365**, 475–476.
- 31 Emanuel PD, Eaves CJ, Broody C, Papayannopoulos T, Moore MR, D'Andrea AD *et al.* (1992) Familial and congenital polycythemia in three unrelated families. *Blood*, **79**, 3019–3030.
- 32 Norberg G (1994) Assessment of risk in occupational cobalt exposures. *Sci Total Environ*, **150**, 201–207.
- 33 Jefferson JA, Escudero E, Hurtado M-E, Pando J, Tapia R, Swenson ER *et al.* (2002) Excessive erythrocytosis, chronic mountain sickness, and serum cobalt levels. *Lancet*, **359**, 407–408.
- 34 Nakanishi T, Sobue I, Tokokura Y, Nishitani H, Kurowa Y, Satayoshi L *et al.* (1984) The Crow-Fukase syndrome: a study of 102 cases in Japan. *Neurology*, **34**, 712–720.
- 35 Richard S, Croisille L, Yvart J, Casadevall N, Eschwège P, Aghakhani N *et al.* (2002) Paradoxical secondary polycythemia in von Hippel-Lindau patients treated with anti-vascular endothelial growth factor receptor therapy. *Blood*, **99**, 3851–3853.
- 36 Comont T, Delavigne K, Cougoul P, Challan-Belval T, Ollier S, Adoue D and Beyne-Rauzy O (2011) Secondary polycythemia during the course of immune thrombocytopenic purpura (ITP) treatment with romiplostim. *Haematologica*, **96**, Suppl. 2, 654.
- 37 Alexandrescu DT, McClure R, Farzanmehr H and Dasanu CA (2008) Secondary erythrocytosis produced by the tyrosine kinase inhibitors sunitinib and sorafenib. *J Clin Oncol*, **26**, 4947–4048.
- 38 Austin T, Bridges N, Markiewicz M and Abrahamson E (1997) Severe neonatal polycythemia after third stage labour underwater. *Lancet*, **350**, 1445.
- 39 Hudson PR, Tandy SC, Child DF, Williams CP and Cavill I (2001) Compensated haemolysis: a consistent feature of diabetes mellitus. *Br J Haematol*, **113**, Suppl. 1, 47.
- 40 Worwood M, Carter K, Jackson HA, Hutton RD and Cavill I (2001) Erythropoiesis and iron status in asymptomatic subjects homozygous for HFE C282Y. *Br J Haematol*, **113**, Suppl. 1, 63.
- 41 Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH and Klug PP (1994) Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*, **330**, 1639–1644.
- 42 Venetz C, Labarère J, Jiménez D and Aujesky D (2013) White blood cell count and mortality in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Hematol*, **88**, 677–681.
- 43 Alvarado A (1986) A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis. *Ann Emerg Med*, **15**, 557–564.
- 44 Nakagawa M, Terashima T, D'yachkova Y, Bondy GP, Hogg JC and van Eeden SF (1998) Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation*, **98**, 2307–2313.
- 45 Herring WB, Smith LG, Walker RI and Herion JC (1974) Hereditary neutrophilia. *Am J Med*, **56**, 729–734.
- 46 Plo I, Zhang Y, Le Couedic J-P, Nakatake M, Boulet J-M, Itaya M *et al.* (2009) An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med*, **206**, 1701–1707.
- 47 Malech HL and Gallin JI (1987) Current concepts: immunology, neutrophils in human disease. *N Engl J Med*, **317**, 687–694.
- 48 Arnaout MA (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, **75**, 1037–1050.

- 49 Etziona A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC and Gershoni-Baruch R (1992) Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med*, **327**, 1789–1792.
- 50 Etzioni A, Doerschuk CM and Harlan JM (1999) Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*, **94**, 3281–3288.
- 51 Alon R, Aker M, Feigelson S, Sokolovsky-Eisenberg M, Staunton DE, Cinamon G *et al.* (2003) A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood*, **101**, 4437–4445.
- 52 Malinin NL, Plow EF and Byzova TV (2010) Kindlins in FERM adhesion. *Blood*, **115**, 4011–4017.
- 53 Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G *et al.* (2011) Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequente form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*, **117**, 6673–6680.
- 54 Tindall JP, Beeker SK and Rose WF (1969) Familial cold urticaria: a generalized reaction involving leukocytosis. *Arch Intern Med*, **124**, 129–134.
- 55 Drenth J and van der Meer JWM (2001) Hereditary periodic fever. *N Engl J Med*, **345**, 1748–1757.
- 56 Dinarello CA (2009) Interleukin-1 and the autoinflammatory diseases. *N Engl J Med*, **360**, 2467–2470.
- 57 Blans MJ, Vos PE, Faber HJ and Boers GH (2001) Coma in a young anorexic woman. *Lancet*, **357**, 1944.
- 58 Duchin JC, Koster FT, Peters CJ, Simpson GL, Tempest B, Zaki SR *et al.* (1994) Hantavirus pulmonary syndrome. *N Engl J Med*, **330**, 949–955.
- 59 Khan AS, Ksiazek TG and Peters CJ (1996) Hantavirus pulmonar syndrome. *Lancet*, **347**, 739–741.
- 60 Phoncharoensri D, Witoonpanich R, Tunlayadechanont S and Laothamatas J (2004) Confusion and paraparesis. *Lancet*, **363**, 1954.
- 61 Amory JK, Rosen H, Sukut C, Wallace F and Saint S (2006) A jaundiced eye. *N Eng J Med*, **354**, 1516–1520.
- 62 Case Records of the Massachusetts General Hospital (2000) Case 29-2000: A 69-year-old renal transplant recipient with low-grade fever and multiple pulmonary nodules. *N Engl J Med*, **343**, 870–877.
- 63 Dobbin CJ, Soni R, Jelihovsky T and Bye PTP (2000) Cepacia syndrome occurring following prolonged colonisation with *Burkholderia cepacia*. *Aust NZ J Med*, **30**, 288–289.
- 64 Case Records of the Massachusetts General Hospital (2002) A 46-year-old woman with extensive pulmonary infiltrates. *N Engl J Med*, **347**, 517–524.
- 65 Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K and Newton CRJC (2003) Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol*, **119**, 839–847.
- 66 Ryan ET, Cronin CG and Branda JA (2011) Case 38-2011: a 34-year-old man with diarrhoea and weakness. *N Engl J Med*, **365**, 2306–2316.
- 67 Matsuoka Y, Yasuda M and Hashizume M (2009) Lung injury and renal failure caused by potassium cyanide poisoning. *BMJ Case Reports*, doi: 10.1136/bcr.04.2009.1768.
- 68 Halevy S (2009) Acute generalized exanthematous pustulosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **9**, 322–328.
- 69 Keatinge WR, Coleshaw SRK, Easton JC, Collier F, Mattock MB and Chelliah R (1986) Increased platelet and red cell counts, blood viscosity, and plasma cholesterol levels during heat stress, and mortality from coronary and cerebral thrombosis. *Am J Med*, **81**, 795–800.
- 70 Kohmura K, Miyakawa Y, Kameyama K, Kizaki M and Ikeda Y (2004) Granulocyte colony stimulating factor-producing multiple myeloma associated with neutrophilia. *Leuk Lymphoma*, **45**, 1475–1479.
- 71 Kanda S, Inoue T, Tsuruta H, Chiba S, Obara T, Saito M *et al.* (2011) [Granulocyte colony stimulating factor-producing spindle cell renal cell carcinoma successfully treated by chemotherapy consisting of gemcitabine and doxorubicin]. *Hinyokika Kyo*, **57**, 385–359. (abstract only read)
- 72 Locker GJ, Kapiotis S, Veitl M, Mader RM, Stoiser B, Kofler J *et al.* (1999) Activation of endothelium by immunotherapy with interleukin-2 in patients with malignant disorders. *Br J Haematol*, **105**, 912–919.
- 73 Ganser A, Lindemann A, Siepelt G, Ottman OG, Herrmann F, Eder M *et al.* (1990) Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with normal haematopoiesis and in patients with bone marrow failure. *Blood*, **76**, 666–676.
- 74 Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike K *et al.* (1990) *In vivo* effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*, **75**, 1602–1605.
- 75 Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP *et al.* (1996) Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood*, **87**, 699–705.
- 76 Gershon SL (1993) Clozapine-deciphering the risks. *N Engl J Med*, **329**, 204–205.
- 77 Harrison P, Cardigan R, Harrison C, Addison I, Chavda N, Chitolie A and Machin SJ (1996) Delayed effect of desmopressin on circulating neutrophils and monocytes. *Br J Haematol*, **95**, 570–571.
- 78 Bienvenu J, Chvetzoff R, Salles G, Balter C, Tilly H, Herbrecht R *et al.* (2001) Tumour necrosis factor α release is a major biological event associated with rituximab treatment. *Hematol J*, **2**, 378–384.
- 79 Dale DC, Bolyard AA, Kelley ML, Westrup EC, Makaryan V, Aprikyan A *et al.* (2011) The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelodysplasia, WHIM syndrome. *Blood*, **118**, 4963–4966.
- 80 Sahoo S (2005) Pathologic quiz case: a 44-year-old man with acute renal failure. *Arch Pathol Lab Med*, **129**, e81–e83.
- 81 Berg RA and Tarantino MD (1991) Envenomation by scorpion *Centruroides exilicauda* (*C. sculpturatus*): severe and unusual manifestations. *Pediatrics*, **87**, 930–933.

- 82 Franca FOS, Benvenuti LA, Fan HW, Dos Santos DR, Hain SH, Picchi-Martins FR *et al.* (1994) Severe and fatal mass attack by 'killer' bees (Africanized honey bee-*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Q J Med*, **87**, 269–282.
- 83 Warrell DA (1998) Antivenoms and treatment of snakebite. *Prescribers J*, **38**, 10–18.
- 84 Mansoor MA, Stakkestad JA and Drablos PA (2013) Higher leukocyte subpopulation counts in healthy smoker industrial workers than in nonsmoker industrial workers: possible health consequences. *Acta Haematol*, **129**, 218–222.
- 85 Cooper PH, Innes DJ and Greer KE (1983) Acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet's syndrome) and myeloproliferative disorders. *Cancer*, **51**, 1518–1526.
- 86 Rosenberg MR and Green M (1989) Neuroleptic malignant syndrome: review of response to therapy. *Arch Intern Med*, **149**, 1927–1931.
- 87 Fenwick JC, Cameron M, Naiman SC, Haley LP, Ronco JJ, Wiggs BR and Tweeddale MG (1994) Blood transfusion as a cause of leucocytosis in critically ill patients. *Lancet*, **344**, 855–856.
- 88 Mayne EE, Fitzpatrick J and Nelson SD (1970) Leucocytosis following administration of cryoprecipitate. *Acta Haematol*, **44**, 155–160.
- 89 Ward H and Reinhard D (1971) Chronic idiopathic leukocytosis. *Ann Intern Med*, **75**, 193–198.
- 90 Dinauer MC (2003) The phagocytic system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 91 Hübner C, Dietz A, Stremmel W, Stiehl A and Andrassy K (1997) Macrolide-induced Churg-Strauss syndrome in a patient with atopy. *Lancet*, **350**, 563.
- 92 Kränke B and Arberer W (1997) Macrolide-induced Churg-Strauss syndrome in patient with atopy. *Lancet*, **350**, 1551–1552.
- 93 Darmstadt GL, Tunnessen WW and Sweren RJ (1992) Eosinophilic pustular folliculitis. *Pediatrics*, **89**, 1095–1098.
- 94 Janin A, Copin MC, Dubos JP, Rouland V, Delaporte E and Blanchet-Bardon C (1996) Familial peeling skin syndrome with eosinophilia: clinical, histologic, and ultrastructural study of three cases. *Arch Pathol Lab Med*, **120**, 662–665.
- 95 Weller PF and Bubley GJ (1994) The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*, **83**, 2759–2779.
- 96 Ryan ET, Wilson ME and Kain KC (2002) Illness after international travel. *N Engl J Med*, **347**, 505–516.
- 97 Sheehan DJ, Rancher BG and McKittrick JC (1986) Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *J Clin Microbiol*, **24**, 548–550.
- 98 Nutman TB (2007) Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. *Immunol Allerg Clin North Amer*, **27**, 529–549.
- 99 Ahmad RN, Sherjil A, Mahmood A and Rafi S (2011) Severe eosinophilia in a case of giardiasis. *Medit J Hemat Infect Dis*, **3**, e2011009.
- 100 Traub RJ (2013) *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. *Int J Parasitol*, **43**, 1009–1015.
- 101 Leder K and Weller PF (2000) Eosinophilia and helminth infections. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 301–317.
- 102 Diaz Camacho SP, Zazueta Ramos M, Ponce Torrecillas E, Osuna Ramirez I, Castro Velazquez R, Flores Gaxiola A *et al.* (1998) Clinical manifestations and immunodiagnosis of gnathostomiasis in Culiacan, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, **59**, 908–915.
- 103 Procvic P and Croese J (1990) Epidemic eosinophilic enteritis in north Queensland caused by common dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Aust NZ J Med*, **20**, 439.
- 104 Yfanti G, Andreadis E, Spiliadou C and Diamantopoulos EJ (1996) A woman with fever and a jejunal stricture. *Lancet*, **347**, 802.
- 105 Fan E, Soong C, Kain KC and Detsky AS (2008) A gut feeling. *N Engl J Med*, **359**, 75–80.
- 106 Petithory J-C (1998) Les éosinophilies familiales: apports de la parasitologie à leur diagnostic. *Bull Acad Natl Med*, **182**, 1823–1835.
- 107 Gomez B, Tabar AI, Tunon T, Larrinaga B, Alvarez MJ, Garcia BE and Olaguibel JM (1998) Eosinophilic gastroenteritis and anisakis. *Allergy*, **53**, 1148–1154.
- 108 Surmont I and Liu LX (1995) Enteritis, eosinophilia, and *Enterobius vermicularis*. *Lancet*, **346**, 1167.
- 109 Marty P (1997) Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in France. A review of reported cases. *Parassitologia*, **39**, 383–386.
- 110 Goto Y, Tamura A, Ishikawa O, Miyachi Y, Ishii T and Akao N (1998) Creeping eruption caused by a larva of the suborder Spirurina type X. *Br J Dermatol*, **139**, 315–318.
- 111 Paine M, Davis S and Brown G (1994) Severe forms of infection with *Angiostrongylus cantonensis* acquired in Australia and Fiji. *Aust NZ J Med*, **24**, 415–416.
- 112 Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS *et al.* (2002) An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travellers returning from the Caribbean. *N Engl J Med*, **346**, 668–675.
- 113 Petithory JC (1996) Can *Ascaris suum* cause visceral larva migrans? *Lancet*, **348**, 689.
- 114 Maruyama H, Nawa Y, Noda S, Mimori T and Choi WY (1996) An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyushu, Japan. *Lancet*, **347**, 1766–1767.
- 115 Dennett X, Andrews J, Siejka S, Beveridge I and Spratt D (1998). New muspiceoid nematode causes eosinophilic polymyositis: two case reports. *Aust Med J*, **168**, 226–227.
- 116 el-Karakasy H, Hassanein B, Okasha S, Behairy B and Gadallah I (1999) Human fascioliasis in Egyptian children: successful treatment with triclabendazole. *J Trop Pediatr*, **45**, 135–138.
- 117 MacLean JD, Arthur JR, Ward BJ, Gyorkos TW, Curtis MA and Kokoskin E (1996) Common-source

- outbreak of acute infection due to the North American liver fluke *Metorchis conjunctus*. *Lancet*, **347**, 154–158.
- 118 Burton K, Yogev R, London N, Boyer K and Shulman ST (1982) Pulmonary paragonimiasis in Lao-tian refugee children. *Pediatrics*, **70**, 246–248.
 - 119 Seymour JF (1997) Splenomegaly, eosinophilia, and pruritis: Hodgkin's disease, or...? *Blood*, **90**, 1719–1720.
 - 120 Wang HY, Zhu GH, Luo SS and Jiang KW (2013) Childhood pentastomiasis: a report of three cases with the following-up data. *Parasitol Int*, **62**, 289–292.
 - 121 Navajas A, Cardenal I, Pinan MA, Ortiz A, Astigarraga I and Fdez-Teijeiro A (1998) Hypereosinophilia due to myiasis. *Acta Haematol*, **99**, 27–30.
 - 122 Rioux JD, Stone VA, Daly MJ, Cargill M, Green T, Nguyen H *et al.* (1998) Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33. *Am J Hum Genet*, **63**, 1086–1094.
 - 123 Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J *et al.* (2003) A tyrosine kinase created by the fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*, **348**, 1201–1214.
 - 124 Bain BJ, Gilliland DG, Horny H-P and Vardiman JW (2008) Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* and *FGFR1*. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* (eds), *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th edn, IARC Press, Lyon.
 - 125 Bae SY, Yiin S-Y, Huh JH, Sung HJ and Choi IK (2007) Hypereosinophilia in biphenotypic (B-cell/T-cell) acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **48**, 1417–1419.
 - 126 Cullen MH, Stansfield AG, Oliver RTD, Lister TA and Malpas JS (1979) Angio-immunoblastic lymphadenopathy: report of ten cases and review of the literature. *Q J Med*, **48**, 151–177.
 - 127 Jayakar V, Goldin RD and Bain BJ (2006) Teaching cases from the Royal Marsden and St Mary's Hospitals: eosinophilia and pruritis. *Leuk Lymphoma*, **47**, 2404–2405.
 - 128 Glantz L, Rintels P, Samoszuk M and Medeiros LJ (1995) Plasma cell myeloma associated with eosinophilia. *Am J Clin Pathol*, **103**, 583–587.
 - 129 Kaplan MH, Hall WW, Susin M, Pahwa S, Salahuddin SZ, Heilman C *et al.* (1991) Syndrome of severe skin disease, eosinophilia, and dermatopathic lymphadenopathy in patients with HTLV-II complicating human immunodeficiency virus infection. *Am J Med*, **91**, 300–309.
 - 130 Aspinall AI, Pinto A, Auer IA, Bridges P, Luider J, Dimnik L *et al.* (2001) Identification of new fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and eosinophilia. *Blood Cells Mos Dis*, **25**, 227–238.
 - 131 Lowe D, Jorizzo J and Hutt MSR (1981) Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol*, **34**, 1343–1348.
 - 132 Case records of the Massachusetts General Hospital (1992) Case 18–1992. *N Engl J Med*, **326**, 1204–1212.
 - 133 Wells GC and Smith NP (1979) Eosinophilic cellulitis. *Br J Dermatol*, **100**, 101–109.
 - 134 Don LJ, Khettry U and Canoso JJ (1978) Progressive systemic sclerosis with eosinophilia and a fulminant course. *Am J Med*, **65**, 346–348.
 - 135 Panush RS, Wilkinson LS and Fagin RR (1973) Chronic active hepatitis associated with Coombs-positive hemolytic anemia. *Gastroenterology*, **64**, 1015–1019.
 - 136 Neeman A and Kadish U (1987) Marked eosinophilia in a patient with primary sclerosing cholangitis. *Am J Med*, **83**, 378–379.
 - 137 Chowdry S, Rubin E and Sass DA (2012) Acute autoimmune hepatitis presenting with peripheral blood eosinophilia. *Ann Hepatol*, **11**, 559–563.
 - 138 Case Records of the Massachusetts General Hospital (1998) A 10-year-old girl with urinary retention and a filling defect in the bladder. *N Engl J Med*, **339**, 616–622.
 - 139 Weschler ME (2007) Pulmonary eosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Amer*, **27**, 477–492.
 - 140 Ezekowitz RAB and Stockman JA (2003) Hematologic manifestations of systemic diseases. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
 - 141 Stone JH, Zen Y and Deshpande V (2012) IgG4-related disease. *N Engl J Med*, **366**, 1646–1647.
 - 142 Karawajczyk M, Höglund M, Ericsson J and Venge P (1997) Administration of G-CSF to healthy subjects: the effects on eosinophil counts and mobilization of eosinophil granule proteins. *Br J Haematol*, **96**, 259–265.
 - 143 Means-Markwell M, Burgess T, de Keratry D, O'Neil K, Mascola J, Fleisher T and Lucey D (2000) Eosinophilia with aberrant T cells and elevated serum levels of interleukin-2 and interleukin-15. *N Engl J Med*, **342**, 1568–1571.
 - 144 van der Graaf W and Borleffs JCC (1994) Eosinophilia in patients with HIV infection. *Eur J Haematol*, **52**, 246–247.
 - 145 Gleich GJ, Schroeter AL, Marcoux P, Sachs MI, O'Connell EJ and Kohler PF (1984) Episodic angioedema associated with eosinophilia. *N Engl J Med*, **310**, 1621–1626.
 - 146 Bullock WE, Artz RP, Bhatena D and Tung KSK (1979) Histoplasmosis: association with circulating immune complexes, eosinophilia, and mesangiocapillary glomerulonephritis. *Arch Intern Med*, **139**, 700–702.
 - 147 Granter SR, Barnhill RL and Duray PH (1996) Borrelial fasciitis: diffuse fasciitis and peripheral eosinophilia associated with *Borrelia* infection. *Am J Dermatopathol*, **18**, 465–473.
 - 148 Mayron LW, Alling S and Kaplan E (1972) Eosinophilia and drug abuse. *Ann Allergy*, **30**, 632–637.
 - 149 Rubin RB and Neugarten J (1990) Cocaine-associated asthma. *Am J Med*, **88**, 438–439.

- 150 Gabriel LC, Escribano LM, Villa E, Leiva C and Valdes MD (1968) Ultrastructural studies of blood cells in toxic oil syndrome. *Acta Haematol*, **75**, 165–170.
- 151 Kilbourne EM, Swygert LA, Philen RM, Sun RK, Auerbach SB, Miller L *et al.* (1990) Interim guidance on the eosinophilia-myalgia syndrome. *Ann Intern Med*, **112**, 85–87.
- 152 Carvajal JA, Anderson R, Weiss L, Grismer J and Berman R (1967) Atheroembolism. An etiologic factor in renal insufficiency, gastrointestinal haemorrhages, and peripheral vascular diseases. *Arch Intern Med*, **119**, 593–599.
- 153 Cogan E, Schandene L, Papadopoulos T, Crusiaux A and Goldman M (1995) Interleukin-5 production by T lymphocytes in atheroembolic disease with hypereosinophilia. *Allergy Clin Immunol*, **96**, 427–429.
- 154 Omenn GS (1965) Familial reticuloendotheliosis with eosinophilia. *N Engl J Med*, **273**, 427–432.
- 155 Nagafuchi S, Tokiyama K, Kashiwagi S, Yayashi S, Imayama S and Niho Y (1993) Eosinophilia after intradermal hepatitis B vaccination. *Lancet*, **342**, 998.
- 156 Lärfors G, Uden-Blohmé AM and Samuelsson J (1996) Fludarabine, as well as 2-chlorodeoxyadenosine, can induce eosinophilia during treatment of lymphoid malignancies. *Br J Haematol*, **94**, 709–712.
- 157 Weiden PL, Bauermeister DE and Fatta EA (1998) An Asian man with enlarged glands. *Lancet*, **351**, 1098.
- 158 Angelis M, Yu M, Takanishi D, Hasaniya NWMA and Brown MR (1996) Eosinophilia as a marker of adrenal insufficiency in the surgical intensive care unit. *J Am Coll Surg*, **183**, 589–596.
- 159 Feussner JR, Shelburne JD, Bredhoeft S and Cohen HJ (1978) Arsenic-induced bone marrow toxicity: ultrastructural and electron-probe analysis. *Blood*, **53**, 820–827.
- 160 Fenollar F, Lepidi H and Raoult D (2001) Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q fever, Bartonella infection, and blood culture-positive endocarditis. *Clin Infect Dis*, **33**, 1309–1316.
- 161 Finsterer J (2007) Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders. *Acta Haematol*, **118**, 88–98.
- 162 Schwarz YA, Kivity S, Fischbein A, Ribak Y, Firemen E, Struhar D *et al.* (1994) Eosinophilic lung reaction to aluminium and hard metal. *Chest*, **105**, 1261–1263.
- 163 Klion AD, Mejia R, Cowen EW, Dowdell KC, Dunleavy K, Fahle GA *et al.* (2013) Chronic active Epstein-Barr virus infection: a novel cause of lymphocytic variant hypereosinophilic syndrome. *Blood*, **121**, 2364–2366.
- 164 Ishii T, Tatekawa T, Koseto M, Ishii M, Kobayashi H, Koike M *et al.* (2003) A case of multicentric Castleman's disease demonstrating severe eosinophilia and enhanced production of interleukin-5. *Eur J Haematol*, **70**, 115–118.
- 165 Hassan HA, Majid RA, Rashid NG, Nuradeen BE, Abdulkarim QH, Hawramy TA *et al.* (2013) Eosinophilic granulomatous gastrointestinal and hepatic abscesses attributable to basidiobolomycosis and fascioliasis: a simultaneous emergence in Iraqi Kurdistan. *BMC Infect Dis*, **13**, 91.
- 166 Hildebrandt GC, Hahn J, Erdmann A, Grube M, Andreesen R and Holler E (2000) Eosinophilia after bone marrow transplantation as a predictor of extensive and sclerodermatous chronic graft versus host disease. *Blood*, **96**, 194a.
- 167 Martinez BM and Domingo P (1997) Acute eosinophilic pneumonia associated with tenidap. *BMJ*, **314**, 349.
- 168 Terzano C and Petroianni A (2003) Clarithromycin and pulmonary infiltration with eosinophilia. *BMJ*, **326**, 1377–1378.
- 169 Crofton JW, Livingstone IL, Oswald NC and Roberts ATM (1952) Pulmonary eosinophilia. *Thorax*, **7**, 1–35.
- 170 Horie S, Okubo Y, Suzuki J and Isobe M (1996) An emaciated man with eosinophilic pneumonia. *Lancet*, **348**, 166.
- 171 Donhuijsen K, Haedicke C, Hattenberger C and Freund M (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-related eosinophilia and Loeffler's endocarditis. *Blood*, **79**, 2798.
- 172 Allen JN and Davis WB (1994) Eosinophilic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, **150**, 1423–1438.
- 173 Schatz M, Wasserman S and Patterson R (1982) The eosinophil and the lung. *Arch Intern Med*, **142**, 1515–1519.
- 174 Fauci AS, Harley JB, Roberts WC, Ferrans VJ, Gralnick HR and Bjornson BH (1982) NIH Conference. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med*, **97**, 78–92.
- 175 Dines DE (1978) Chronic eosinophilic pneumonia. *Mayo Clin Proc*, **53**, 129–130.
- 176 Pandit R, Scholnik A, Wulfekuhler L and Dimitrov N (2007) Non-small-cell lung cancer associated with excessive eosinophilia and secretion of interleukin-5 as a paraneoplastic syndrome. *Am J Hematol*, **82**, 234–237.
- 177 Todenhofer T, Wirths S, von Weyern CH, Heckl S, Horger M, Hennenlotter J *et al.* (2012) Severe paraneoplastic hypereosinophilia in metastatic renal cell carcinoma. *BMC Urology*, **12**, 7.
- 178 Rapanotti MC, Caruso R, Ammatuna E, Zaza S, Trotta L, Divona M *et al.* (2010) Molecular characterization of paediatric idiopathic hypereosinophilia. *Br J Haematol*, **151**, 440–446.
- 179 Vaughan Hudson B, Linch DC, Macintyre EA, Bennett MH, MacLennan KA, Vaughan Hudson G and Jelliffe AM (1987) Selective peripheral blood eosinophilia associated with survival advantage in Hodgkin's disease (BNLI Report No 31). British National Lymphoma Investigation. *J Clin Pathol*, **40**, 247–250.
- 180 Simon HU, Plötz SG, Dummer R and Blaser K (1999) Abnormal clones of interleukin-5-producing T cells in idiopathic eosinophilia. *N Engl J Med*, **341**, 1112–1120.
- 181 Beishuizen A, Vermes I, Hylkema BS and Haanen C (1999) Relative eosinophilia and functional adrenal

- insufficiency in critically ill patients. *Lancet*, **353**, 1675–1676.
- 182 Loughlin KR (2000) Hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*, **342**, 442.
 - 183 Andersen CL, Siersma VD, Hasselbalch HC, Lindegaard H, Vestergaard H, Felding P *et al.* (2013) Eosinophilia in routine blood samples and the subsequent risk of hematological malignancies and death. *Am J Hematol*, **88**, 843–847.
 - 184 Tokuhira M, Watanabe R, Iizuka A, Sekiguchi Y, Nemoto T, Hanzawa K *et al.* (2006) De novo CD5+ diffuse large B cell lymphoma with basophilia in the peripheral blood: successful treatment with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Hematol*, **82**, 162–167.
 - 185 Davies JK, Telfer P, Cavenagh JD, Foot N and Neat M (2003) Case Report. Autoimmune cytopenias in the 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Lab Haematol*, **25**, 195–197.
 - 186 Snow AL, Xiao W, Stinson JR, Lu W, Chaigne-Delalande B, Zheng L *et al.* (2012) Congenital B cell lymphocytosis explained by novel germline *CARD11* mutations. *J Exp Med*, **209**, 2247–2261.
 - 187 Olson LC, Miller G and Hanshaw JB (1964) Acute infectious lymphocytosis presenting as a pertussis-like illness: its association with adenovirus type 12. *Lancet*, **i**, 200–201.
 - 188 Anonymous (1968) Lymphocytopoietic viruses. *N Engl J Med*, **279**, 432–433.
 - 189 Mandal BK and Stokes KJ (1973) Acute infectious lymphocytosis and enteroviruses. *Lancet*, **ii**, 1392–1393.
 - 190 Nkrumah FK and Addy PAK (1973) Acute infectious lymphocytosis. *Lancet*, **i**, 1257–1258.
 - 191 Horwitz CA, Henle W, Henle G, Polesky H, Balfour HH, Siem RA *et al.* (1977) Heterophile-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illnesses. *Am J Med*, **63**, 947–957.
 - 192 Rosenblatt JD, Plaeger-Marshall S, Giorgi JV, Swanson P, Chen ISY, Chin E *et al.* (1990) A clinical, hematologic, and immunologic analysis of 21 HTLV-I infected intravenous drug users. *Blood*, **76**, 409–417.
 - 193 Rogers L (1905) The blood changes in plague. *J Pathol*, **10**, 291–295.
 - 194 Kvasnicka HM, Thiele J and Ahmadi T (2003) Bone marrow manifestation of Lyme disease (Lyme borreliosis). *Br J Haematol*, **120**, 723.
 - 195 Caldwell CW and Lacombe F (2000) *Evaluation of Peripheral Blood Lymphocytosis*. Academic Information Systems, Santa Cruz.
 - 196 Heller HM, Telford SR and Brandt JA (2005) Case records from the Massachusetts General Hospital: case 10-2005: a 73-year-old man with weakness and pain in the legs. *N Engl J Med*, **352**, 1358–1364.
 - 197 McDonald JC, MacLean JD and McDade JE (1988) Imported rickettsial disease: clinical and epidemiologic features. *Am J Med*, **85**, 799–805.
 - 198 Wilson ME, Brush AD and Meany MC (1989) Murine typhus acquired during short-term urban travel. *Am J Med*, **57**, 233–234.
 - 199 Carulli G, Lagomarsini G, Azzarà A, Testi R, Riccioni R and Petrini M (2004) Expansion of TcR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (CD4/CD8 double-negative) T lymphocytes in a case of staphylococcal toxic shock syndrome. *Acta Haematol*, **111**, 163–167.
 - 200 Bates I, Bedu-Addo G, Bevan DH and Rutherford TR (1991) Use of immunoglobulin gene rearrangements to show clonal lymphoproliferation in hyper-reactive malarial splenomegaly. *Lancet*, **337**, 505–507.
 - 201 Weatherall D and Kwiatkowski D (2003) Hematologic manifestations of systemic diseases in children in developing countries. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn. Saunders, Philadelphia.
 - 202 Groom DA, Kunkel LA, Brynes RK, Parker JW, Johnson CS and Endres D (1990) Transient stress lymphocytosis during crisis of sickle cell anaemia and emergency trauma and medical conditions. *Arch Pathol Lab Med*, **114**, 570–576.
 - 203 Wentworth P, Salonen V and Pomeroy J (1991) Transient stress lymphocytosis during crisis of sickle cell anaemia. *Arch Pathol Lab Med*, **115**, 211.
 - 204 Chow K-C, Nacilla JQ, Witzig TE and Li C-Y (1992) Is persistent polyclonal B lymphocytosis caused by Epstein-Barr virus? A study with polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. *Am J Hematol*, **41**, 270–275.
 - 205 Kerrigan DP, Castillo A, Foucar K, Townsend K and Neidhart J (1989) Peripheral blood morphologic changes after high-dose antineoplastic chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration. *Am J Clin Pathol*, **92**, 280–285.
 - 206 Lascari AD (1984) *Hematologic Manifestations of Childhood Diseases*. Theme-Stratton, New York.
 - 207 Kapadia A, de Sousa M, Markenson AL, Miller DR, Good RA and Gupta S (1980) Lymphoid cell sets and serum immunoglobulins in patients with thalassaemia intermedia: relationship to serum iron and splenectomy. *Br J Haematol*, **45**, 405–416.
 - 208 Marti GE, Ryan ET, Papadopoulos NM, Filling-Katz M, Barton N, Fleischer TA *et al.* (1988) Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinaemia in patients with Gaucher's disease. *Am J Hematol*, **29**, 189–194.
 - 209 Medeiros LJ, Bhagat SK, Naylor P, Fowler D, Jaffe E and Stetler-Stevenson M (1993) Malignant thymoma associated with T-cell lymphocytosis. *Arch Pathol Lab Med*, **117**, 279–283.
 - 210 Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y *et al.* (1997) Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood*, **15**, 1341–1348.
 - 211 Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Paterakis G, Phisphis M and Stefanoudaki-Sofianatou K (2002) Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Research*, **26**, 597–600.

- 212 Mariette X, Tsapis A, Oksenhendler E, Daniel M-T, d'Agay M-F, Berger R and Brouet J-C (1993) Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease featuring blood atypical polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*, **85**, 813–815.
- 213 Lesesve J-F, Debouverie M, Decarvalho Bittencourt M and Béné M-C (2011) CD49d blockade by natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis increases immature B-lymphocytes. *Bone Marrow Transplantation*, **46**, 1489–1491.
- 214 Chang BY, Francesco M, De Rooij MF, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM *et al.* (2013) Egress of CD19(+) CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*, **122**, 2412–2424.
- 215 Fry RW, Morton AR, Crawford GP and Keast D (1992) Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **64**, 218–227.
- 216 Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C and Cameron LC (2007) Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med*, **41**, 523–530.
- 217 Nielsen HB, Secher NH, Kristensen JH, Christensen NJ, Espersen K and Pedersen BK (1997) Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *Am J Physiol*, **272**, R1847–R1852.
- 218 Kho AN, Hui S, Kesterson JG and McDonald CJ (2007) Which observations from the complete blood cell count predict mortality for hospitalized patients? *J Hosp Med*, **2**, 5–12.
- 219 Cook PD, Osborn CD, Helbert BJ and Rappaport ES (1991) Cleaved lymphocytes in pertussis. *Am J Clin Pathol*, **96**, 428.
- 220 Milne TM, Cavenagh JD, Macey MG, Dale C, Howes D, Wilkes S and Newland AC (1998) Large granular lymphocyte (LGL) expansion in 20 HIV infected patients: analysis of immunophenotype and clonality. *Br J Haematol*, **101**, Suppl. 1, 107.
- 221 Nagata Y, Ohashi K, Fukuda S, Kamata N, Akiyama H and Sakamaki H (2010) Clinical features of dasatinib-induced large granular lymphocytosis and pleural effusion. *Int J Hematol*, **91**, 799–807.
- 222 Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R *et al.* (2010) Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*, **116**, 772–782.
- 223 Maldonado J and Hanlon DG (1965) Monocytosis: a current appraisal. *Mayo Clin Proc*, **40**, 248–259.
- 224 Glaser RM, Walker RI and Herion JC (1970) The significance of hematologic abnormalities in patients with tuberculosis. *Arch Intern Med*, **125**, 691–695.
- 225 Dorfman DH and Glader JH (1990) Congenital syphilis presenting in infants after the newborn period. *N Engl J Med*, **323**, 1299–1302.
- 226 Piankijagum A, Visudhiphan S, Aswapokee P, Suwanagool S, Kruatrachue M and Na-Nakorn S (1977) Hematological changes in typhoid fever. *J Med Assoc Thai*, **60**, 828–838.
- 227 Bhatia P, Haldar D, Varma N, Marwaha RK and Varma S (2011) A case series highlighting the relative frequencies of the common, uncommon and atypical/unusual hematological findings on bone marrow examination in cases of visceral leishmaniasis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, **3**, e2011035.
- 228 Gutman JD, Kotton CN and Kratz A (2003) Case Records of the Massachusetts General Hospital, Case 29-2003: a 60-year-old man with fever, rigors, and sweats. *N Engl J Med*, **349**, 1168–1175.
- 229 Reddy S, Jia S, Geoffrey R, Lorier R, Suchi M, Broeckel U *et al.* (2009) An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the *IL1RN* locus. *N Engl J Med*, **360**, 2438–2444.
- 230 Barrett O'N (1970) Monocytosis in malignant disease. *Ann Intern Med*, **73**, 991–992.
- 231 Schmitz LL, McClure JS, Letz CE, Dayton V, Weisdorf DJ, Parkin IL and Brunning RD (1994) Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *Am J Clin Pathol*, **101**, 67–75.
- 232 Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP *et al.* (1996) Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood*, **87**, 699–705.
- 233 Lebsack ME, McKenna HJ, Hoek JA, Hanna R, Feng A, Marashovsky E and Hayes FA (1997) Safety of FLT3 ligand in healthy volunteers. *Blood*, **90**, Suppl. 1, 170a.
- 234 Meisel SR, Pauzner H, Shechter M, Zeidan Z and David D (1998) Peripheral monocytosis following acute myocardial infarction: incidence and its possible role as a bedside marker of the extent of cardiac injury. *Cardiology*, **90**, 52–57.
- 235 Raska K, Raskova J, Shea SM, Frankel RM, Wood RH, Lifter J *et al.* (1983) T cell subsets and cellular immunity in end-stage renal disease. *Am J Med*, **75**, 734–740.
- 236 Pisani RJ, Witzig TE, Li CY, Morris MA and Thibodeau SN (1990) Confirmation of lymphomatous pulmonary involvement by immunophenotypic and gene rearrangement analysis of bronchoalveolar lavage fluid. *Mayo Clin Proc*, **65**, 651–656.
- 237 Rao VK and Oliveira JB (2011) How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, **118**, 5741–5751.
- 238 Tadmor T, Benyamini N, Avivi I, Attias D and Polliack A (2012) Absolute monocyte count is associated with adverse prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a validation study in a cohort of 219 patients from two centers. *Haematologica*, **97**, Suppl. 1, 127.
- 239 Aoki K, Tabata S, Yonetani N, Matsushita A and Ishikawa T (2013) The prognostic impact of absolute lymphocyte and monocyte counts at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Acta Haematol*, **130**, 242–246.
- 240 Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, Habermann TM, Witzig TE, Inwards DJ *et al.* (2012) Peripheral blood

- lymphocyte/ monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, **97**, 262–269.
- 241 Porrata LF, Ristow K, Habermann TM, Witzig TE, Colgan JP, Inwards DJ *et al.* (2012) Peripheral blood lymphocyte/ monocyte ratio at diagnosis and survival in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, **157**, 321–330.
 - 242 von Hohenstaufen KA, Conconi A, de Campos CP, Franceschetti S, Bertoni F, Casaluci G M *et al.* (2013) Prognostic impact of monocyte count at presentation in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **162**, 465–473.
 - 243 Moake IL, Landry PR, Oren ME, Sayer BL and Hefner LT (1974) Transient peripheral plasmacytosis. *Am J Clin Pathol*, **62**, 8–15.
 - 244 Ghilardi N, Wiestner A, Kikuchi M, Ohsaka A and Skoda RC (1999) Hereditary thrombocythaemia in a Japanese Family is caused by a novel point mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol*, **107**, 310–316.
 - 245 Fujiwara T, Hariqae H, Kameoka J, Yokoyama H, Takahashi S, Tomiya Y *et al.* (2004) A case of familial thrombocytosis: possible role of altered thrombopoietin production. *Am J Hematol*, **76**, 395–397.
 - 246 Sturhmann M, Bashawri L, Ahmed MA, Al-Awamy BH, Kühnau W, Schmidtke J and El-Harith EA (2001) Familial thrombocytosis as a recessive, possibly X-linked trait in na Arab family. *Br J Haematol*, **112**, 616–620.
 - 247 Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A *et al.* (2004) Familial essential thrombocythaemia associated with a dominant-positive activating mutation of the *c-MPL* gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, **103**, 4198–4200.
 - 248 Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG and Spivak JL (2004) Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 11444–11447.
 - 249 Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE and Schuh A (2012) Germline *JAK2* mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med*, **366**, 967–969.
 - 250 Etheridge L, Corbo LM, Kaushansky K, Chan E and Hitchcock IS (2011) A novel activating *JAK2* mutation, *JAK2R564Q*, causes familial essential thrombocytosis (JET) via mechanism distinct from *JAK2 V617F*. *Blood*, **118**, 123. (ASH Annual Meeting Abstracts)
 - 251 Pickering D and Cuddigan B (1969) Infantile cortical hyperostosis associated with thrombocythaemia. *Lancet*, **ii**, 464–465.
 - 252 Gazda HT and Sieff CA (2006) Recent insights into the pathogenesis of Diamond–Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, **135**, 149–157.
 - 253 Williams MS, Ettinger RS, Hermanns P, Lee B, Carlsson G, Taskinen M and Mäkitie O (2005) The natural history of severe anemia in cartilage-hair hypoplasia. *Am J Med Genet A*, **138**, 35–40.
 - 254 Losada R, Espinosa E, Hernández C, Dorticos E and Hernández P (1996) Thrombocytosis in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. *Br J Haematol*, **95**, 704–705.
 - 255 Maartens G, Willcox PA and Benatar SR (1990) Miliary tuberculosis: rapid diagnosis, hematologic abnormalities, and outcome in 109 treated adults. *Am J Med*, **89**, 291–296.
 - 256 Meade RH and Brandt L (1982) Manifestations of Kawasaki disease in New England outbreak of 1980. *J Pediatr*, **100**, 558–562.
 - 257 Pol RJ and Howard MR (2014) Anemia and thrombocytopenia. *Blood*, **123**, 1783.
 - 258 Feigert JM, Sweet DL, Coleman M, Variakojis D, Wisch N, Schulman J and Markowitz MH (1990) Multicentric angiofollicular lymph node hyperplasia with peripheral neuropathy, pseudotumor cerebri, IgA dysproteinaemia, and thrombocytosis in women: a distinct syndrome. *Ann Intern Med*, **113**, 362–367.
 - 259 Gherardi RK, Maleport D and Degos J-D (1991) Castleman disease-POEMS syndrome overlap. *Ann Intern Med*, **114**, 520–521.
 - 260 Brezis M and Lafair J (1979) Thrombocytosis in chronic eosinophilic pneumonia. *Chest*, **76**, 231–232.
 - 261 Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, Carter RA, Cherry JK, Sundell B *et al.* (2000) Effects of megakaryocyte growth development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy volunteers. *Blood*, **95**, 2514–2533.
 - 262 Weber J, Yang IC, Topalian SL, Parkinson DR, Schwartzentruber DS, Ettinghausen SE *et al.* (1993) Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*, **11**, 499–506.
 - 263 Kaushansky K (1996) The thrombocytopenia of cancer. Prospects for effective cytokine therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, **10**, 431–455.
 - 264 Halpérin DS, Wacker P, Lacourt G, Félix M, Babel J-E, Aapro M and Wyss M (1990) Effects of recombinant human erythropoietin in infants with anemia of prematurity: a pilot study. *J Pediatr*, **116**, 779.
 - 265 Ritchie JH, Fish MB, McMasters V and Grossman M (1968) Edema and hemolytic anemia in premature infants. A vitamin E deficiency syndrome. *N Engl J Med*, **279**, 1185–1190.
 - 266 Bornstein Y, Rausen AR and Peterson CM (1982) Duration of thrombocytosis in infants of polydrug (including methadone) users. *J Pediatr*, **100**, 506.
 - 267 Case Records of the Massachusetts General Hospital (2000) A 41-year-old man with multiple bony lesions and adjacent soft tissue masses. *N Engl J Med*, **342**, 875–884.
 - 268 Kuijpers TW, Maianaski NA, Tool ATJ, Smit PA, Rake JP, Roos D and Visser G (2003) Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type Ib (GSD1b). *Blood*, **101**, 5021–5024.
 - 269 Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA *et al.* (2000) Mutation in the gene

- encoding neutrophil elastase in congenital and cyclical neutropenia. *Blood*, **96**, 2317–2322.
- 270 Dweck A, Blickstein D, Elstein D and Zimran A (2002) Thrombocytosis associated with enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Acta Haematol*, **108**, 94–96.
- 271 Sabel AL, Gaudiani JL, Statland B and Mehler PS (2013) Hematological abnormalities in severe anorexia nervosa. *Ann Hematol*, **92**, 605–613.
- 272 Monagle P and Andrew M (2003) Developmental hemostasis: relevance to newborns and infants. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 273 Schilling RF (1980) Platelet millionaires. *Lancet*, **ii**, 372–373.
- 274 Jones MI and Pierre RV (1981) The causes of extreme thrombocytosis. *Am J Clin Pathol*, **76**, 349.
- 275 Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML, Richards F and Case LD (1994) Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases. *Am J Med*, **96**, 247–253.
- 276 Santhosh-Kumar CR, Yohannan MD, Higgy KE and al-Mashhadani SA (1991) Thrombocytosis in adults: analysis of 777 patients. *J Intern Med*, **229**, 493–495.
- 277 Spigel SC and Mooney LR (1977) Extreme thrombocytosis associated with malignancy. *Cancer*, **39**, 339–341.
- 278 Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman IL, Windmiller J, Lammi AT *et al.* (1979) A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolation of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr*, **95**, 976–984.
- 279 Nieken J, Mulder NH, Buter J, Vellenga E, Limburg PC, Piers DA and de Vries EG (1995) Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients. *Blood*, **86**, 900–905.
- 280 Bussel JB, Mukherjee R and Stone AJ (2001) A pilot study of rhuIL-11 treatment of refractory ITP. *Am J Hematol*, **66**, 172–177.
- 281 Gola b J, Zagodz on R, Stoklosa T, Lasek W, Jakóbiśiak M, Pojda Z and Machaj E (1998) Erythropoietin prevents the development of interleukin-12-induced anemia and thrombocytopenia but does not decrease its antitumor activity in mice. *Blood*, **91**, 4387–4388.
- 282 Biaggioni I, Robertson D, Krantz S, Jones M and Haile V (1994) The anemia of primary autonomic failure and its reversal with recombinant erythropoietin. *Ann Intern Med*, **121**, 181–186.
- 283 Gomes MER, Deinum J, Timmers HJLNM and Lenders JWM (2003) Occam's razor: anaemia and orthostatic hypotension. *Lancet*, **363**, 1282.
- 284 Puig J, Corcoy R and Rodriguez-Espinosa J (1998) Anemia secondary to vitamin D intoxication. *Ann Intern Med*, **128**, 602–603.
- 285 Perrotta S, Nobili B, Rossi F, Criscuolo M, Iolascon A, Di Pinto D *et al.* (2002) Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a retinol-dependent bone marrow growth inhibition. *Blood*, **99**, 2017–2022.
- 286 Hammett-Stabler CA, Broussard LA, Winecker RE and Roper-Miller JD (2002) New insights into an old poison, arsenic. *Lab Med*, **33**, 437–447.
- 287 Arai S and Vogelsang GB (2000) Management of graft-versus-host disease. *CME Bulletin Haematology*, **14**, 190–204.
- 288 Ishani A, Weinhandl E, Zhao Z, Gilbertson DT, Collins AJ, Yusuf S and Herzog CA (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibitor as a risk factor for the development of anemia, and the impact of incident anemia on mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, **45**, 391–399.
- 289 Schwarzbeck A, Wittenmeier KW and Hällfritzsch U (1998) Anaemia in dialysis patients as a side-effect of sartanes. *Lancet*, **352**, 286.
- 290 Dickinson M and Juneja S (2009) Haematological toxicity of colchicine. *Br J Haematol*, **146**, 465.
- 291 Steer A, Daley AJ and Curtis N (2005) Suppurative sequelae of symbiosis. *Lancet*, **365**, 188.
- 292 Fisch P, Handgretinger R and Schaefer H-E (2000) Pure red cell aplasia. *Br J Haematol*, **111**, 1010–1022.
- 293 Winkler M, Schulze F, Jost U, Ringe B and Pichlmayr R (1993) Anaemia associated with Fk-506 immunosuppression. *Lancet*, **341**, 1035–1036.
- 294 Lin Y-W, Okazaki S, Hamahata K, Watanabe K-i, Asami I, Yoshiyoshi M *et al.* (1999) Acute pure red cell aplasia associated with allopurinol therapy. *Am J Hematol*, **61**, 209–211.
- 295 Tanaka N, Ishida F and Tanaka E (2004) Ribavirin-induced red-cell aplasia during treatment of hepatitis C. *N Engl J Med*, **350**, 1264–1265.
- 296 Niebrugge DJ, Benjamin DR, Christie D and Scott CR (1982) Hereditary transcobalamin II deficiency presenting as red cell hypoplasia. *J Pediatr*, **101**, 732–735.
- 297 Tauchi T, Iwama H, Kaku H, Kimura Y and Ohyashiki K (1999) Remission of pure-red-cell aplasia associated with operative cure of lung cancer. *Am J Hematol*, **61**, 157–158.
- 298 Baker RI, Manoharan A, de Luca E and Begley CG (1993) Pure red cell aplasia of pregnancy: a distinct clinical entity. *Br J Haematol*, **85**, 619–622.
- 299 Volin L and Ruutu T (1990) Pure red-cell aplasia of long duration after major ABO-incompatible bone marrow transplantation. *Acta Haematol*, **84**, 195–197.
- 300 Bolan CD, Leitman SF, Griffith LM, Wesley RA, Procter JL, Stroncek DF *et al.* (2001) Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **98**, 1687–1694.
- 301 Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J-J, Martin-Dupont P *et al.* (2002) Pure red cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med*, **346**, 469–475.
- 302 Lau KS and White JC (1969) Myeloid sclerosis associated with systemic lupus erythematosus in patients in West Malaysia. *J Clin Pathol*, **22**, 433–438.
- 303 Yetgin S and Ozsoylu S (1982) Myeloid metaplasia in vitamin D deficiency rickets. *Scand J Haematol*, **28**, 180–185.

- 304 Ravindranath Y, Paglia DE, Warriar I, Valentine W, Nakatani M and Brockway RA (1987) Glucose phosphate isomerase deficiency as a cause of hydrops fetalis. *N Engl J Med*, **316**, 258–261.
- 305 Kanno H, Ishikawa K, Fujii H and Miwa S (1997) Severe hexokinase deficiency as a cause of hemolytic anemia, periventricular leucomalacia and intra-uterine death of the fetus. *Blood*, **90**, Suppl. 1, 8a.
- 306 Rodriguez V, Godwin JE, Ogburn PL, Smithson WEA and Fairbanks VF (1997) Severe anemia and hydrops fetalis in hereditary xerocytosis. *Blood*, **90**, Suppl. 1, 18b.
- 307 Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomez C, Texier P, Lemos C *et al.* (2000) Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with total absence of band 3. *Blood*, **96**, 1602–1604.
- 308 Arnon S, Tamary H, Dgany O, Litmanovitz I, Regev R, Bauer R *et al.* (2004) Hydrops fetalis associated with homozygosity for hemoglobin Taybe (α 38/39 THR deletion) in newborn triplets. *Am J Hematol*, **76**, 263–266.
- 309 Laosombat V, Viprakasit V, Dissaneevate S, Leetanaporn R, Chotsampancharoen T, Wongchanchailert M *et al.* (2010) Natural history of Southeast Asian Ovalocytosis during the first 3 years of life. *Blood Cells Mol Dis*, **45**, 29–32.
- 310 Brugnara C and Platt OS (2003) The neonatal erythrocyte and its disorders. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn. Saunders, Philadelphia.
- 311 Game L, Bergounioux J, Close JP, Marzouka BE and Thein SL (2003) A novel deletion causing ($\epsilon\gamma\delta\beta$)⁰ thalassaemia in a Chilean family. *Br J Haematol*, **123**, 154–159.
- 312 Perez N, Dommergues M, Zupan V, Chambost H, Fieschi JB, Delaunay J *et al.* (2000) Severe congenital dyserythropoietic anaemia type I: prenatal management, transfusion support and alpha-interferon therapy. *Br J Haematol*, **110**, 420–421.
- 313 Van Hook JW, Gill P, Cyr D and Kapur RP (1995) Diamond-Blackfan anemia as an unusual cause of nonimmune hydrops fetalis: a case report. *J Reprod Med*, **40**, 850–854.
- 314 Goldwurm S, Casati C, Venturi N, Strada S, Santambrogio P, Indraccolo S *et al.* (2000) Biochemical and genetic defects underlying human congenital hypotransferrinemia. *Hematol J*, **1**, 390–398.
- 315 McDonnell M, Hannam S and Devane SP (1998) Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **78**, F220–F221.
- 316 Nolan B, Hinchliffe R and Vora A (2000) Neonatal pure red cell aplasia due to maternal anti-M. *Blood*, **96**, 8a.
- 317 Gray ES, Balch NJ, Kohler H, Thompson WD and Simson JG (1986) Congenital leukaemia: an unusual cause of stillbirth. *Arch Dis Child*, **61**, 1001–1006.
- 318 Swann IL and Kendra JR (1998) Anaemia, vitamin E deficiency and failure to thrive in an infant. *Clin Lab Haematol*, **20**, 61–63.
- 319 Lasky EA (1991) Polycythaemia in the newborn infant. In: Hann IM, Gibson BES, Lasky EA (eds), *Fetal and Neonatal Haematology*. Baillière Tindall, London.
- 320 Benson AB, Moss M and Silliman CC (2009) Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a clinical review with emphasis on the critically ill. *Br J Haematol*, **147**, 431–443.
- 321 Kuijpers TW, Maïanski NA, Tool ATJ, Becker K, Plecko B, Valianpour F *et al.* (2004) Neutrophils in Barth syndrome (BTHS) avidly bind annexin-V in the absence of apoptosis. *Blood*, **103**, 3915–3923.
- 322 Sinha S, Watkins S and Corey SJ (2001) Genetic and biochemical characterization of a deletional mutation of the extra-cellular domain of the human G-CSF receptor in a child with severe congenital neutropenia unresponsive to Neupogen. *Blood*, **98**, 440a.
- 323 Ancliff PJ, Blundell MP, Gale RE, Liesner R, Hann IM, Thrasher AJ and Linch DC (2001) Activating mutations in the Wiskott Aldrich Syndrome protein may define a subgroup of severe congenital neutropenia (SCN) with specific and unusual laboratory features. *Blood*, **98**, 439a.
- 324 Ancliff PJ (2003) Congenital neutropenia. *Blood Rev*, **17**, 209–216.
- 325 Person RE, Li F-Q, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA *et al.* (2003) Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nature Genet*, **34**, 308–312.
- 326 Bohn G, Allroth A, Brandes G, Thiel J, Glocker E, Schäffer AA *et al.* (2007) A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nat Med*, **13**, 38–45.
- 327 Badolato R, Prandini A, Caracciolo S, Colombo E, Tabellini G, Giacomelli M *et al.* (2012) Exome sequencing reveals a pallidin mutation in a Hermansky-Pudlak-like primary immunodeficiency syndrome. *Blood*, **119**, 3185–3187.
- 328 Sieff CA, Nisbet-Brown E and Nathan DG (2000) Congenital bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol*, **111**, 30–42.
- 329 Parmley RT, Crist WM, Ragab AH, Boxer LA, Maluh A, Liu VK and Darby CP (1980) Congenital dysgranulopoietic neutropenia: clinical, serologic, ultrastructural and *in vitro* proliferative characteristics. *Blood*, **56**, 465–475.
- 330 Wetzler M, Talpaz M, Kleinerman ES, King A, Huh YO, Gutterman JU and Kurzrock R (1990) A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med*, **89**, 663–672.
- 331 Hadžić N, Pagliuca A, Relat M, Portmann B, Jones A, Veys P *et al.* (2000) Correction of the hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, **342**, 320–324.
- 332 Ziedler C (2005) Congenital cytopenias: congenital neutropenias. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 306–311.
- 333 Pitcher LA, Taylor KM, Bartold PM, Seow K, Tong YH and Fanning S (1996) Filgrastim used successfully for asymptomatic neutropenia in Cohen's syndrome. *Aust NZ J Med*, **26**, 258.
- 334 van den Tweel JG (1997) Preleukaemic disorders in children: hereditary disorders and myelodysplastic syndromes. *Current Diagnostic Pathol*, **4**, 45–50.

- 335 Casadevall N, Croisille L, Auffray I, Tchernia G and Coulombel L (1994) Age-related alterations in erythroid and granulopoietic progenitors in Diamond Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, **87**, 369–375.
- 336 Aksu G, Kütükçüler N, Genel F, Vergin C and Omowaire B (2003) Griscelli syndrome without hemophagocytosis in an eleven-year-old girl: expanding the phenotypic spectrum of *Rab27A* mutations in humans. *Am J Med Genet*, **116A**, 329–333.
- 337 Corral J, Gonzalez-Conejero R, Pujol-Moix N, Domenech P and Vicente V (2004) Mutation analysis of HPS1, the gene mutated in Hermansky-Pudlak syndrome, in patients with isolated platelet dense-granule deficiency. *Haematologica*, **89**, 325–329.
- 338 Glasser L, Meloni-Ehrig A, Joseph P and Mendiola J (2006) Benign chronic neutropenia with abnormalities involving 16q22, affecting mother and daughter. *Am J Hematol*, **81**, 262–270.
- 339 Porter WM, Hardman CM, Abdalla SH and Powles AV (1999) Haematological disease in siblings with Rothmund-Thomson syndrome. *Clin Exp Dermatol*, **24**, 452–454.
- 340 Roe TF, Coates TD, Thomas DW, Miller JH and Gilsanz V (1992) Treatment of chronic inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib with colony-stimulating factors. *N Engl J Med*, **326**, 1666–1669.
- 341 Ino T, Sherwood G, Cutz E, Benson LN, Rose IV and Freedman RM (1988) Dilated cardiomyopathy with neutropenia, short stature and abnormal carnitine metabolism. *J Pediatr*, **113**, 511–514.
- 342 Ronghe M, Cantlay AM, Chasty RC, Allen JT, Pennock CA, Oakhill A and Steward CG (1998) Exclusion of organic acid disorders in children with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol*, **101**, Suppl. 1, 74.
- 343 Susa JS, Bennett MJ and Jones PM (2003) Lethargy, failure to thrive, and vomiting in a neonate. *Lab Med*, **34**, 775–778.
- 344 Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkötter C, Golden BE, Richmond P, Klein N *et al.* (2003) Hyperzincaemia with hypercalproteinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet*, **360**, 1742–1745.
- 345 Parvaneh N, Ziaee V, Moradinejad MH, Touitou I (2014) Intermittent neutropenia as an early feature of mild mevalonate kinase deficiency. *J Clin Immunol*, **34**, 123–126.
- 346 Al Mulla ZS and Christensen RD (1995) Neutropenia in the neonate. *Clin Perinatol*, **22**, 711–739.
- 347 Hien TT, Liem NT, Dung NT, San LT, Mai PP, Chau N N van V *et al.* (2004) Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med*, **350**, 1179–1188.
- 348 Griffin M and Makris M (2013) Vaccination induced neutropenia. *Int J Lab Hematol*, **35**, e33.
- 349 Penchansky L and Jordan JA (1997) Transient erythroblastopenia of childhood associated with human herpesvirus type 6, variant B. *Am J Clin Pathol*, **108**, 127–132.
- 350 Hashimoto H, Maruyama H, Fujimoto K, Sakakura T, Seishu S and Okuda N (2002) The hematologic findings associated with thrombocytopenia during the acute phase of exanthem subitum confirmed by primary human herpesvirus-6 infection. *J Pediatr Hematol Oncol*, **24**, 211–214.
- 351 Pont J, Puchhammer-Stockl E, Chott A, Popow-Kraupp T, Kienzer H, Postner G and Honetz N (1992) Recurrent granulocytic aplasia as clinical presentation of a persistente parvovirus B19 infection. *Br J Haematol*, **80**, 160–165.
- 352 Salas R, de Manzione N, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, Betancourt A *et al.* (1991) Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet*, **338**, 1033–1036.
- 353 Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, Mirza S, Khurshid M and McCormick JB (1995) Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet*, **346**, 472–475.
- 354 Schanen A, Gallou G, Hincly JM and Saron MF (1998) A rash, circulating anticoagulant, then meningitis. *Lancet*, **351**, 1856.
- 355 Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM *et al.* (2003) A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*, **348**, 1986–1994.
- 356 Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL *et al.* (2011) Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*, **364**, 1523–1532.
- 357 McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG *et al.* (2012) A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N Engl J Med*, **367**, 834–841.
- 358 Sheehan V, Weir A and Waters B (2013) Severe neutropenia in patients with chronic hepatitis C: a benign condition. *Acta Haematol*, **129**, 96–100.
- 359 Pullen RL and Stuart BM (1945) Tularemia. *JAMA*, **129**, 495–500.
- 360 Sheehy TW, Hazlett D and Turk RE (1973) Scrub typhus: a comparison of chloramphenicol and tetracycline in its treatment. *Arch Intern Med*, **132**, 77–80.
- 361 Brettman LR, Lewin S, Holzman RS, Goldman WD, Marr JS, Kechijian P and Schinella R (1981) Rickettsial pox: report of an outbreak and a contemporary review. *Medicine*, **60**, 363–372.
- 362 Parola P, Jourdan J and Raoult D (1998) Tick-borne infection caused by *Rickettsia africae* in the West Indies. *N Engl J Med*, **338**, 1391.
- 363 Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dummer JS, Kurti TJ and Munderloh UG (1996) Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*, **334**, 209–215.
- 364 Tencic S (2011) Babesiosis in a returned traveller – the first Australian case. AIMS/NZIMLS Congress, Gold Coast.
- 365 Goodwin RA, Shapiro JL, Thurman GH, Thurman SS and des Prez RM (1980) Disseminated histoplasmosis: clinical and pathological correlations. *Medicine*, **59**, 1–33.
- 366 Perkisas S, Vrelust I, Martin M, Gadisseur A and Schroyens W (2011) A warning about agranulocytosis with the use of cocaine adulterated with levamisole. *Acta Clin Belg*, **66**, 226–227.

- 367 Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B, Firtion G *et al.* (1999) Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet*, **354**, 1084–1089.
- 368 Voog E, Morschhauser F and Solal-Céligny P (2003) Neutropenia in patients treated with rituximab. *N Engl J Med*, **348**, 2691–2694.
- 369 Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D *et al.* (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed refractory myeloma. *N Engl J Med*, **348**, 2609–2617.
- 370 Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ *et al.* (2002) Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumours. *N Engl J Med*, **347**, 472–480.
- 371 Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB and Magilavy DB (2010) An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **363**, 1303–1312.
- 372 Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G *et al.* (2012) Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*, **366**, 1181–1189.
- 373 Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E *et al.* (2012) Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*, **366**, 1190–1199.
- 374 DeJesus CE, Egen J, Metzger M, Alvarez X, Combs CA, Malide D *et al.* (2011) Transient neutropenia after granulocyte-colony stimulating factor administration is associated with neutrophil accumulation in pulmonary vasculature. *Exp Hematol*, **39**, 142–150.
- 375 Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS *et al.* (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **369**, 507–516.
- 376 Eisenmenger W, Drasch G, von Clarmann M, Kretschmer E and Roeder G (1991) Clinical and morphological findings on mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] poisoning. *J Forensic Sci*, **36**, 1688–1698.
- 377 Wallis JP, Haynes S, Stark G, Green FA, Lucas GF and Chapman CD (2002) Transfusion-related alloimmune neutropenia: an undescribed complication of blood transfusion. *Lancet*, **360**, 1073–1074.
- 378 Mariani M, Cattaneo A, Bottelli G, Pagni L, Mosca F, Comonbo F *et al.* (2011) Severe neonatal alloimmune neutropenia in a newborn delivered by a CD16 deficient Gypsy woman. *Haematologica*, **96**, Suppl. 2, 341.
- 379 Kameoka J, Funato T, Miura T, Harigae H, Saito J, Yokoyama H *et al.* (2001) Autoimmune neutropenia in pregnant women causing neonatal neutropenia. *Br J Haematol*, **114**, 198–200.
- 380 Bux J and Mueller-Eckhardt C (1992) Autoimmune neutropenia. *Semin Hematol*, **29**, 45–53.
- 381 Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, Anagnostopoulos A, Papadaki T, Eliopoulos AG and Eliopoulos GD (2005) Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol*, **128**, 863–876.
- 382 McClain K, Estrov Z, Chen H and Mahoney DH (1993) Chronic neutropenia of childhood: frequent association with parvovirus infection and correlations with bone marrow culture studies. *Br J Haematol*, **85**, 57–62.
- 383 Cline MI, Opelz G, Saxon A, Fahey JL and Golde DW (1976) Autoimmune panleukopenia. *N Engl J Med*, **295**, 1489–1493.
- 384 Levitt LJ, Ries CA and Greenberg PL (1983) Pure White cell aplasia: antibody-mediated autoimmune inhibition of granulopoiesis. *N Engl J Med*, **308**, 1141–1146.
- 385 Longhurst HJ, O'Grady C, Evans G, De Lord C, Hughes A, Cavenagh J and Helbert MR (2002) Anti-D immunoglobulin treatment for thrombocytopenia associated with primary antibody deficiency. *J Clin Pathol*, **55**, 64–66.
- 386 Niehues T, Schwarz K, Schneider M, Schroten H, Schroder E, Stephan V and Wahn V (1996) Severe combined immunodeficiency (SCID) associated neutropenia: a lesson from monozygotic twins. *Arch Dis Child*, **74**, 340–342.
- 387 Marques MB, Tuncer HH, Divers SG, Baker AC and Harrison DK (2005) Acute transient leucopenia as a sign of TRALI. *Am J Hematol*, **80**, 90–91.
- 388 Anderlini P, Przepiora D, Champlin R and Körbling M (1996) Peripheral blood stem cell apheresis in normal donors: the neglected side. *Blood*, **88**, 3663–3664.
- 389 Liu YK (1973) Leukopenia in alcoholics. *Am J Med*, **54**, 605–610.
- 390 Kubota M, Tsukamoto R, Kurokawa K, Imai T and Furusho K (1996) Elevated serum interferon gamma and interleukin-6 in patients with necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease). *Br J Haematol*, **95**, 613–615.
- 391 Cordano A, Placko RP and Graham GG (1966) Hypocupremia and neutropenia in copper deficiency. *Blood*, **28**, 280–283.
- 392 Miyoshi I, Saito T and Iwahara Y (2004) Copper deficiency anaemia. *Br J Haematol*, **125**, 106.
- 393 Shoenfeld Y, Shaklai M, Ben-Baruch N, Hirschorn M and Pinkhas J (1982) Neutropenia induced by hypercarotenaemia. *Lancet*, **i**, 1245.
- 394 Koenig IM and Christensen RD (1989) Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. *N Engl J Med*, **321**, 557–562.
- 395 Engle WD and Rosenfeld CR (1984) Neutropenia in highrisk neonates. *J Pediatr*, **105**, 982–986.
- 396 Zach TL, Steinhorn RH, Georgieff MK, Mills MM and Green TP (1990) Leukopenia associated with extracorporeal membrane oxygenation in newborn infants. *J Pediatr*, **116**, 440–443.
- 397 Rogers ZR, Bergstrom SK, Amylon MD, Buchanan GR and Glader BE (1989) Reduced neutrophil counts in children with transient erythroblastopenia of childhood. *J Pediatr*, **115**, 746–748.

- 398 Lundin J, Kimby E, Björkholm M, Broliden P-A, Gelsing F, Hjalmar V *et al.* (2002) Phase II trial of subcutaneous anti-CD53 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath 1H) in the first-line treatment of chronic lymphocytic leucemia (B-CLL). *Blood*, **100**, 768–773.
- 399 Cuilliere-Dartigues P, Meyohas MC, Balladur P, Gorin NC and Coppo P (2010) Splenic sarcoidosis: an unusual aetiology of agranulocytosis. *Am J Hematol*, **85**, 891.
- 400 Abdollahpour H, Appaswamy G, Kotlarz D, Diestelhorst J, Beier R, Schäffer AA *et al.* (2012) The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*, **119**, 3450–3457.
- 401 Archer RK, Engisch HJC, Gaha T and Ruxton J (1971) The eosinophil leucocytes in the blood and bone marrow of patients with Down's anomaly. *Br J Haematol*, **21**, 271–276.
- 402 Nakahata T, Spicer SS, Leary AG, Ogawa M, Franklin W and Goetzl EJ (1984) Circulating eosinophil colony-forming cells in pure eosinophil aplasia. *Ann Intern Med*, **101**, 321–324.
- 403 Juhlin LL and Michaelsson G (1977) A new syndrome characterized by absence of eosinophils and basophils. *Lancet*, **i**, 1233–1235.
- 404 Welles SL, Mueller N, Tachibana N, Shishime E, Okayama A, Murai K and Tsuda K (1991) Decreased eosinophil numbers in HTLV-I carriers. *Lancet*, **337**, 987.
- 405 Grattan CEH, Dawn G, Gibbs S and Francis DM (2003) Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Immunol*, **33**, 337–341.
- 406 Vinh DC, Patel SY, Uzel G, Anderson VL, Freeman AF, Olivier KN *et al.* (2010) Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood*, **115**, 1519–1529.
- 407 Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY *et al.* (2011) Mutations in *GATA2* are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*, **118**, 2653–2655.
- 408 Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B and Laroche O (2013) High frequency of *GATA2* mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood*, **121**, 822–829.
- 409 Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J *et al.* (2011) IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med*, **365**, 127–138.
- 410 Gossage DL and Buckley RH (1990) Prevalence of lymphocytopenia in severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, **323**, 1422–1423.
- 411 Wyllie DH, Bowler ICJW and Peto TEA (2004) Relation between lymphopenia and bacteraemia in UK adults with medical emergencies. *J Clin Pathol*, **57**, 950–955.
- 412 Hasenclever D and Diehl V (1998) A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*, **339**, 1506–1514.
- 413 Kim YR, Kim JS, Kim SJ, Jung HA, Kim SJ, Kim WS *et al.* (2011) Lymphopenia is an important prognostic factor in peripheral T-cell lymphoma (NOS) treated with anthracycline-containing chemotherapy. *J Hematol Oncol*, **4**, 34.
- 414 Aoki T, Nishiyama T, Imahashi N and Kitamura K (2011) Lymphopenia following the completion of first-line therapy predicts early relapse in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*, **91**, 375–382.
- 415 Tashima M, Nishikikori M, Kitawaki T, Hishizawa M, Izumi T, Fujiwara Y *et al.* (2010) Idiopathic CD4 lymphocytopenia due to loss of heterozygosity of the mutant CD2 gene. *Blood*, **116**, 1143–1144.
- 416 Wickramasinghe SN (1998) Congenital dyserythropoietic anaemias: clinical features, haematological morphology and new biochemical data. *Blood Rev*, **12**, 178–200.
- 417 Mrowietz U and Reich K (2013) Case reports of PML in patients treated for psoriasis. *N Engl J Med*, **369**, 1080–1081.
- 418 Hou M, Horney E, Stockelberg D, Jacobsson S, Kutti J and Wadenvik H (1997) Multiple quinine-dependent antibodies in a patient with episodic thrombocytopenia, neutropenia, lymphocytopenia, and granulomatous hepatitis. *Blood*, **90**, 4806–4811.
- 419 Berglund B and Eklblom B (1991) Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med*, **229**, 125–130.
- 420 Cummins D, Wilson ME, Foulgar KJ, Dawson D and Hogarth AM (1995) Effects of influenza vaccination on the blood counts of people aged over 65: case report and prospective study. *Br J Haematol*, **101**, Suppl. 1, 54.
- 421 Symmons DPM, Farr M, Salmon M and Bacon PA (1989) Lymphopenia in rheumatoid arthritis. *J Roy Soc Med*, **82**, 462–463.
- 422 Budman DR and Steinberg AD (1977) Hematologic aspects of systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*, **86**, 220–229.
- 423 Daniele RP and Rowlands DT (1976) Lymphocyte subpopulations in sarcoidosis: correlation with disease activity and duration. *Ann Intern Med*, **85**, 593–600.
- 424 Bynoe AG, Scott CS, Ford P and Roberts BE (1983) Decreased T helper cells in the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **54**, 97–102.
- 425 Jacobs NL, Holtan SG, Porrata LF, Markovic SN, Tefferi A and Steensma DP (2010) Host immunity affects survival in myelodysplastic syndromes: independent prognostic value of the absolute lymphocyte count. *Am J Hematol*, **85**, 160–163.
- 426 Bowers TK and Eckert E (1978) Leukopenia in anorexia nervosa: lack of an increased risk of infection. *Arch Intern Med*, **138**, 1520–1523.
- 427 Santos PC and Falcao RP (1990) Decreased lymphocyte subsets and K-cell activity in iron deficiency anemia. *Acta Haematol*, **84**, 118–121.

- 428 Robbins G and Brozovic B (1985) Lymphocytopenia in regular platelet apheresis donors. *Br J Haematol*, **61**, 558–559.
- 429 Unkrig CJ, Schroder R and Scharf RE (1994) Lorenzo's oil and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **330**, 577.
- 430 Masci AM, Palmieri G, Vitiello L, Montella L, Perna F, Orlandi P *et al.* (2003) Clonal expansion of CD8⁺BV8 T lymphocytes in bone marrow characterizes thymoma-associated B lymphopenia. *Blood*, **101**, 3106–3108.
- 431 Christodouleas JP, Forrest RD, Ainsley CG, Tochner Z, Hahn SM and Glatstein E (2011) Short-term and longterm health risks of nuclear-power-plant accidents. *N Engl J Med*, **364**, 2334–2341.
- 432 Lackner A, Basu O, Bierings M, Lassay L, Schaefer UW, Révész T *et al.* (2000) Haematopoietic stem cell transplantation for amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **109**, 773–775.
- 433 Alter B (2003) Inherited bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT, *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn. Saunders, Philadelphia.
- 434 Roberts IA and Murray NA (1999) Management of thrombocytopenia in neonates. *Br J Haematol*, **105**, 864–870.
- 435 Koenig JM and Christensen RD (1989) Neutropenia and thrombocytopenia in infants with Rh hemolytic disease. *J Pediatr*, **114**, 625–631.
- 436 Wagner T, Bernaschek G and Geissler G (2000) Inhibition of megakaryopoiesis by Kell-related antibodies. *N Engl J Med*, **343**, 72.
- 437 Blanchette VS, Johnson J and Rand M (2000) The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 365–390.
- 438 Abelman W and Virchis A (2005) An unusual cause of thrombocytopenia. *Clin Lab Haematol*, **27**, 215–216.
- 439 Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S and Watson SP (2011) Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood*, **117**, 5198–5206.
- 440 Bhattacharyya J, Kumar R, Tyagi S, Kishore J, Mahapatra M and Choudhry VP (2005) Human parvovirus B19-induced acquired pure amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **128**, 128–129.
- 441 Radonić A, Oswald O, Thulke S, Brockhaus N, Nitsche A, Siegert W and Schetelig J (2005) Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, **131**, 480–482.
- 442 García-Suárez J, Burgaleta C, Hernanz N, Albarran F, Tobaruela P and Alvarez-Mon M (2000) HCV-associated thrombocytopenia: clinical characteristics and platelet response after recombinant $\alpha 2b$ -interferon therapy. *Br J Haematol*, **110**, 98–103.
- 443 Hoffman R (1991) Acquired pure amegakaryocytic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*, **28**, 303–312.
- 444 Fogarty PF, Stetler-Stevenson M, Pereira A and Dunbar CE (2005) Large granular lymphocytic proliferation-associated cyclic thrombocytopenia. *Am J Hematol*, **79**, 334–336.
- 445 Ando M, Iwamoto Y, Suda A, Tsuchiya K and Nihei H (2001) New insights into the thrombopoietic status of patient on dialysis through the evaluation of megakaryocytopoiesis in bone marrow and of endogenous thrombopoietin levels. *Blood*, **97**, 915–921.
- 446 Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M and Kuter DJ (2001) Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood*, **98**, 3241–3248.
- 447 Curtis BR, Ali S, Aitman TJ, Ebert DD, Lenes BA and Aster RH (2001) Maternal isoimmunization against CD36 (GPIV) should be considered in unresolved cases of apparent immune neonatal thrombocytopenia. *Blood*, **98**, 710a.
- 448 Dickerman JD, Holbrook PR and Zinkham WH (1972) Etiology and therapy of thrombocytopenia associated with sarcoidosis. *J Pediatr*, **81**, 758–764.
- 449 Parameswaran R, Cavenagh JD, Davies JK and Newland AC (1999) Immune cytopenias as the presenting feature of common variable immune deficiency. *Br J Haematol*, **105**, Suppl. 1, 51.
- 450 West KA, Anderson DR, McAlister VC, Hewlett TJ, Belitsky P, Smith JW and Kelton JG (1999) Alloimmune thrombocytopenia after organ transplantation. *N Engl J Med*, **341**, 1504–1507.
- 451 Solenthaler M, Krauss JK, Boehlen F, Koller R, Hug M and Lammle B (1999) Fatal fresh frozen plasma infusion containing HPA-1a alloantibodies. *Br J Haematol*, **106**, 258–259.
- 452 Bakchoul T, Zöllner H, Amiral J, Panzer S, Selleng S, Kohlmann T *et al.* (2013) Anti-protamine-heparin antibodies: incidence, clinical relevance, and pathogenesis. *Blood*, **121**, 2821–2827.
- 453 Royer DJ, George JN and Terrell DR (2010) Thrombocytopenia as an adverse effect of complementary and alternative medicines, herbal remedies, nutritional supplements, foods, and beverages. *Eur J Haematol*, **84**, 421–429.
- 454 Warkentin TE (2007) Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia 2 from purpura to thrombosis. *N Engl J Med*, **356**, 891–893.
- 455 Jubelirer SJ, Koenig BA and Bates MC (1999) Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am J Hematol*, **62**, 205–208.
- 456 Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, Curtis BR, Malik M, Levine S *et al.* (2002) Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupies GPIIb/IIIa. *Blood*, **100**, 2071–2076.
- 457 Aster RH and Bougie DW (2007) Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **357**, 580–587.
- 458 Arnold J, Ouwehand WH, Smith GA and Cohen H (1998) A young woman with petechiae. *Lancet*, **351**, 618.
- 459 Lavy R (1964) Thrombocytopenic purpura due to lupinus termis bean. *J Allergy Clin Immunol*, **35**, 386–389.

- 460 Azuno Y, Taga K, Sasayama T and Kimoto K (1996) Thrombocytopenia induced by Jui, a traditional Chinese herbal medicine. *Lancet*, **354**, 394–305.
- 461 Wright JG (1992) Severe thrombocytopenia secondary to asymptomatic cytomegalovirus infection in an immunocompetent host. *J Clin Pathol*, **45**, 1037–1038.
- 462 Kitamura K, Ohta H, Ihara T, Kamiya H, Ochi-ai H, Yamanishi K and Tanaka K (1994) Idiopathic thrombocytopenic purpura after human herpesvirus 6 infection. *Lancet*, **344**, 830.
- 463 Bauduer F, Marty F, Larrouy M and Ducout L (1998) Immunologic thrombocytopenic purpura as presenting symptom of hepatitis C infection. *Am J Hematol*, **57**, 338–340.
- 464 Singh NM and Gangappa M (2007) Acute immune thrombocytopenia associated with hepatitis E in an adult. *Am J Hematol*, **82**, 942–943.
- 465 Beanie RM (1993) Mycoplasma and thrombocytopenia. *Arch Dis Child*, **68**, 250.
- 466 Castagnola E, Dufour C, Timitilli A and Giacchino R (1994) Idiopathic thrombocytopenic purpura associated with Scarlet fever. *Arch Dis Child*, **70**, 164.
- 467 al-Majed SA, al-Momen AK, al-Kassimi FA, al-Zeer A, Kambal AM and Baaqil H (1995) Tuberculosis presenting as immune thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol*, **94**, 135–138.
- 468 Spedini P (2002) Tuberculosis presenting as imune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, **87**, EL-TO9.
- 469 Gürkan E, Başlamışli F, Güvenç B, Bozkurt B and Ünsal Ç (2003) Immune thrombocytopenic purpura associated with *Brucella* and *Toxoplasma* infections. *Am J Hematol*, **74**, 52–54.
- 470 Franchini M and Veneri D (2003) *Helicobacter pylori* infection and immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, **88**, 1087–1091.
- 471 Munchhof WJ, Runnegar N, Gray TJ, Taylor C, Palmer C and Holley A (2007) Two rare severe and fulminant presentations of Q fever in patients with minimal risk factors for this disease. *Intern Med J*, **37**, 775–778.
- 472 Gao H-N, Lu H-Z, Cao B, Du B, Shang H, Gan J-H *et al.* (2013) Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med*, **368**, 2277–2285.
- 473 Leissinger CA (1990) Severe thrombocytopenia associated with cocaine abuse. *Ann Intern Med*, **112**, 708–710.
- 474 Hesseling PB (1992) Onyalai. *Bailliere's Clin Haematol*, **5**, 457–473.
- 475 Kiaii M, Djurdjev O, Farah M, Levin A, Jung B and MacRae J (2011) Use of electron-beam sterilized hemodialysis membranes and risk of thrombocytopenia. *JAMA*, **306**, 1679–1687.
- 476 Schulman I, Pierce M, Lukens A and Currimbhoy Z (1960) Studies on thrombopoiesis I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*, **16**, 943–957.
- 477 Upshaw JD (1978) Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **298**, 1350–1352.
- 478 Rees DC, Iolascon A, Carella M, O'Marcaigh AS, Kendra JR, Jowitt SN *et al.* (2005) Stomatocytic haemolysis and macrothrombocytopenia (Mediterranean stomatocytosis/ macrothrombocytopenia) is the haematological presentation of phytosterolaemia. *Br J Haematol*, **130**, 297–309.
- 479 Mulliken, JB, Anupindi S, Ezekowitz RAB and Mihm MC (2004) Case records of the Massachusetts General Hospital, Case 13-2004: a newborn girl with a large cutaneous lesion, thrombocytopenia, and anemia. *N Engl J Med*, **350**, 1764–1775.
- 480 Watkins NA, Rankin A, Smith GA, Schaffner-Reckinger E, Kieffer N, Laffan M and Ouwehand WH (2006) A novel inherited form of familial thrombocytopenia due to na autosomal dominant mutation in the cytoplasmic domain of the platelet beta3integrin that is associated with expression. of activation dependent alphaIIb/beta3 epitopes. *Brit J Haematol*, **133**, Suppl. 1, 19.
- 481 Paciucci PA, Mandeli J, Oleksowicz L, Ameglio F and Holland JF (1990) Thrombocytopenia during immunotherapy with interleukin-2 by constant infusion. *Am J Med*, **89**, 308–312.
- 482 Locker GJ, Kapiotis S, Veitl M, Mader RM, Stoiser B, Kofler J *et al.* (1999) Activation of endothelium by immunotherapy with interleukin-2 in patients with malignant disorders. *Br J Haematol*, **105**, 912–919.
- 483 Maddocks S and O'Brien R (2000) African trypanosomiasis in Australia. *N Engl J Med*, **342**, 1254.
- 484 Lee JJ, Levitt L and Lin AY (2012) Case 2-2012: dyspnoea and rapidly progressive respiratory failure. *N Engl J Med*, **366**, 1647.
- 485 McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM and Thomas ED (1984) Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology*, **4**, 116–122.
- 486 Kitchens CS (2004) Thrombocytopenia due to acute venous thromboembolism and its role in expanding the differential diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol*, **76**, 69–73.
- 487 Van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, Cespedes J, Lora J, Peredo C *et al.* (1999) Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. *Lancet*, **354**, 1559–1562.
- 488 Sexton DJ, Rollin PE, Breitschwerdt EB, Corey GR, Myers SA, Dumais MR *et al.* (1997) Life-threatening Cache Valley virus infection. *N Engl J Med*, **336**, 547–549.
- 489 Goh KJ, Tan CT, Chew NK, Tan PSK, Kamarulzaman A, Sarji SA *et al.* (2000) Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med*, **342**, 1229–1235.
- 490 Charrel RN, de Lamballerie X and Raoult D (2007) Chikungunya outbreaks 2 the globalization of vectorborne diseases. *N Engl J Med*, **356**, 769–771.
- 491 Vyas JM, González RG and Pierce VM (2013) Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 15-2013. A 76-year-old man with fever, worsening renal function, and altered mental status. *N Engl J Med*, **368**, 1919–1927.

- 492 Madani TA, Azhar EI, Abuelzein el-TM, Kao M, Al-Bar HM, Abu-Araki H *et al.* (2011) Alkhumra (Alkhurma) virus outbreak in Najran, Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *J Infect*, **62**, 67–76.
- 493 Pinn TG and Sowden D (1998) Queensland tick typhus. *Aust NZ J Med*, **28**, 824–826.
- 494 Thiebaut MM, Bricaire F and Raoult D (1997) Scrub typhus after a trip to Vietnam. *N Engl J Med*, **336**, 1613–1614.
- 495 Roberts SA and Ellis-Pegler RB (1997) Murine typhus in the Kaukapakapa area again. *Aust NZ J Med*, **27**, 446–447.
- 496 Pritt BS, Sloan LM, Johnson DKH, Munderloh UG, Paskewitz SM, McElroy KM *et al.* (2011) Emergence of a new pathogenic Ehrlichia species, Wisconsin and Minnesota, 2009. *N Engl J Med*, **365**, 422–429.
- 497 Brouqui P, Lascala B, Roux V and Raoult D (1999) Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med*, **340**, 184–189.
- 498 Bush LM, Abrams BH, Beall A and Johnson CC (2001) Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. *N Engl J Med*, **345**, 1607–1610.
- 499 Sevinc A, Kutlu NO, Kuku I, Ozgen U, Aydogdu I and Soyulu H (2000) Severe epistaxis in brucellosis-induced isolated thrombocytopenia: a report of two cases. *Clin Lab Haematol*, **22**, 373–375.
- 500 Serefhanoglu K, Kaya E, Sevinc A, Aydogdu I, Kuku I and Ersoy Y (2003) Isolated thrombocytopenia: the presenting feature of typhoid fever. *Clin Lab Haematol*, **25**, 63–65.
- 501 Tunbridge AJ, Dockrell DH, Channer KS and McKendrick MW (2002) A breathless triathlete. *Lancet*, **359**, 130.
- 502 Vonderheide RH, Thadhani R and Kuter DJ (1996) Association of thrombocytopenia and the use of intra-aortic balloon pump. *Blood*, **88**, Suppl. 1, 63b.
- 503 Turnbull A and Almeyda J (1970) Idiopathic thrombocytopenic purpura and Kaposi's sarcoma. *Proc R Soc Med*, **63**, 603–605.
- 504 Kimura H, Nasu K, Sakai C, Shiga Y, Miyamoto E, Shintaku M *et al.* (1998) Histiocytic sarcoma of the spleen associated with hypoalbuminemia, hypoglobulinemia and thrombocytopenia as a possibly unique clinical entity 2 report of three cases. *Leuk Lymphoma*, **31**, 217–224.
- 505 Baker GR and Levin J (1998) Transient thrombocytopenia produced by administration of macrophage colony-stimulating factor: investigations of the mechanism. *Blood*, **91**, 89–99.
- 506 Diaz-Sánchez CL, Lifshitz-Guinzburg A, Ignacio-Ibarra G, Halabe-Cherem J and Quinones-Galvan A (1998) Survival after massive (>2000) Africanized honeybee stings. *Arch Intern Med*, **158**, 925–927.
- 507 Clayton PT, Bowron A, Mills KA, Massoud A, Casteels M and Milla PJ (1993) Phytosterolaemia in children with parental nutrition-associated cholestatic liver disease. *Gastroenterology*, **105**, 1806–1813.
- 508 Auborg P (1994) Lorenzo's oil and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **330**, 577.
- 509 O'Brien H, Amess JAL and Mollin JD (1982) Recurrent thrombocytopenia, erythroid hypoplasia and sideroblastic anaemia associated with hypothermia. *Br J Haematol*, **51**, 451–456.
- 510 Jung J, Bohn G, Allroth A, Boztug K, Brandes G, Sandrock I *et al.* (2006) Identification of a homozygous deletion in the AP3B1 gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. *Blood*, **108**, 362–369.
- 511 Dittman WA (2000) Congenital relapsing fever (*Borrelia hermsii* infection). *Blood*, **96**, 3333.
- 512 Willoughby MLN (1977) *Paediatric Haematology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- 513 Neven B, Valayannopoulos V, Quartier P, Blanche S, Prieur AM, Debre M *et al.* (2007) Allogeneic bone marrow transplantation in mevalonic aciduria. *N Engl J Med*, **356**, 2700–2703.
- 514 Bader-Meunier B, Breton-Gorius B, Cramer E, Mielot F, Rötig A, Dommergues JP and Tchernia G (1997) Hematology: a clue to the diagnosis of mitochondrial cytopathies. *Blood*, **96**, Suppl. 1, 9b.
- 515 Hayward CP, Rivard GE, Kane WH, Drouin J, Zheng S, Moore JC and Kelton JG (1996) An autosomal dominant, qualitative platelet disorder associated with multimerin deficiency, abnormalities in platelet factor V, thrombospondin, von Willebrand factor, and fibrinogen and an epinephrine aggregation defect. *Blood*, **87**, 4967–4978.
- 516 Shalev H, Kapelusnik J, Moser A, Dgany O, Krasnov T and Tamary H (2004) A comprehensive study of the neonatal manifestations of congenital dyserythropoietic anemia type I. *J Pediatr Hematol Oncol*, **26**, 746–748.
- 517 Zeidler C (2005) Congenital neutropenia. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 306–311.
- 518 Maurer HM, Fratkin M, McWilliams NB, Kirkpatrick D, Draper DW, Haggins JC and Hunter CR (1976) Effects of phototherapy on platelet counts in low-birthweight infants and on platelet production and life span in rabbits. *Pediatrics*, **57**, 506–512.
- 519 Ballin A, Korea G, Kohelet D, Burger R, Greenwald M, Bryan AC and Zipursky A (1987) Reduction in platelet counts induced by mechanical ventilation in the newborn infants. *J Pediatr*, **111**, 445–449.
- 520 Yang J, Lee C-H, Yang M, Li K, Ng P-C, Yuen M-P and Fok T-F (2001) Association between thrombocytopenia and mechanical ventilation in infants with respiratory distress syndrome. *Blood*, **98**, 37a.
- 521 Carroll DN, Kamath P and Stewart L (2005) Congenital viral infection? *Lancet*, **365**, 1110.
- 522 Kurata Y, Nishioeda Y, Tsubakio T and Kitani T (1980) Thrombocytopenia in Graves' disease: effect of T3 on platelet kinetics. *Acta Haematol*, **63**, 185–190.
- 523 Bowles KM, Turner GE and Wimperis JZ (2004) Resolution of chronic severe refractory thrombocytopenia after treatment of hypothyroidism. *J Clin Pathol*, **57**, 995–996.
- 524 Pei SX, Chen XJ, Si Ren BZ, Liu YH, Cheng XS, Harris EM *et al.* (1989) Chronic mountain sickness in Tibet. *Q J Med*, **71**, 555–574.
- 525 Takahashi N and Nishida H (1997) New exanthematous disease with thrombocytopenia in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **77**, F79.

- 526 Prella M, Baccalà R, Horisberger J-D, Belin D, di Raimondo F, Invernizzi R *et al.* (2001) Haemolytic onset of Wilson's disease in a patient with homozygous truncation of ATP7B at ARG1319. *Br J Haematol*, **114**, 230–232.
- 527 Fischereder M and Jaffe JP (1994) Thrombocytopenia following acute acetaminophen overdose. *Am J Hematol*, **45**, 258–259.
- 528 Acharya S and Bussel JB (2000) Hematologic toxicity of sodium valproate. *J Pediatr Hematol Oncol*, **22**, 62–65.
- 529 Pamuk GE, Donmez S, Turgut B, Demir M and Vural O (2005) Rituximab-induced acute thrombocytopenia in a patient with prolymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, **78**, 81.
- 530 Shah C and Grethlein SJ (2004) Case report of rituximab-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol*, **75**, 263.
- 531 Smith KA, Nelson PN, Warren P, Astley SJ, Murray PG and Greenman J (2004) Demystified... recombinant antibodies. *J Clin Pathol*, **57**, 912–917.
- 532 Cathomas R, Goldhirsch A and von Moos R (2007) Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **358**, 1869–1870.
- 533 Azuno Y, Yaga K, Sasayama T and Kimoto K (1999) Thrombocytopenia induced by Jui, a traditional Chinese herbal medicine. *Lancet*, **354**, 304–305.
- 534 <http://www.ouhsc.edu/platelets/index.html> (accessed June 2014).
- 535 Ranjith MP, Divya R, Mehta VK, Krishnan MG, KamalRaj R and Kavishwar A (2009) Significance of platelet volume indices and platelet count in ischaemic heart disease. *J Clin Pathol*, **62**, 830–833.
- 536 Hohlfield P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD and Daffos F (1994) Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood*, **84**, 1851–1856.
- 537 Roberts I, Stanworth S and Murray NA (2008) Thrombocytopenia in the neonate. *Blood Rev*, **22**, 173–186.
- 538 Chakravorty S and Roberts I (2012) How I manage neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **156**, 155–162.
- 539 Nunes P, Palaré MJ, Aguilar S, Ferrao A, Medeira A and Moraes A (2011) Serious thrombocytopenia as hematological manifestation of Noonan syndrome. *Haematologica*, **96**, Suppl. 2, 651.
- 540 Chng WJ and Howard MR (2001) Pel-Ebstein fever with cyclical pancytopenia. *J R Soc Med*, **94**, 84–85.
- 541 Gonzalez CH, Durkin-Stamm MV, Geimer NF, Shahidi NT, Schilling RE, Rubira F and Opitz JM (1977) The WT syndrome2 a “new” autosomal dominant pleiotropic trait of radial/ulnar hypoplasia with high risk of bone marrow failure and/or leukemia. *Birth Defects Orig Artic Ser*, **13**(3B), 31–38.
- 542 Ihara K, Ishii I, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good RA and Hara T (1999) Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 3132–3136.
- 543 Gonzalez-del Angel A, Cervera M, Gómez L, Perez-Vera P, Orozco L, Carnevale A, Del Castillo V (2000) Ataxiapanicytopenia syndrome. *Am J Med Genet*, **90**, 252–254.
- 544 Press OW, Fingert H, Lott IT and Dickersin R (1983) Pancytopenia in mannosidosis. *Arch Intern Med*, **143**, 1266–1268.
- 545 Hricik DE and Hussain R (1984) Pancytopenia and hepatosplenomegaly in oxalosis. *Arch Intern Med*, **144**, 167–168.
- 546 Kelleher JF, Yudkoff M, Hutchinson R, August CS and Cohn RM (1980) The pancytopenia of isovaleric acidemia. *Pediatrics*, **65**, 1023–1027.
- 547 Walter MJ and Dang CV (1998) Pancytopenia secondary to oxalosis in a 23-year-old woman. *Blood*, **91**, 4394.
- 548 Emadi A, Burns KH, Confer B and Borowitz MJ (2008) Hematological manifestations of nephropathic cystinosis. *Acta Haematol*, **119**, 169–172.
- 549 Blatt J, Katerji A, Barmada M, Wenger SL and Panchansky L (1994) Pancytopenia and vacuolation of marrow precursors associated with necrotizing encephalopathy. *Br J Haematol*, **86**, 207–209.
- 550 Kind T, Levy J, Lee M, Kaicker S, Nicholson J and Kane SA (2002) Cobalamin C disease presenting as hemolytic-uremic syndrome in the neonatal period. *J Pediatr Hematol Oncol*, **24**, 327–329.
- 551 Çetin M, Hiçsönmez G and Göğüs S (1998) Myelodysplastic syndrome associated with Griscelli syndrome. *Leuk Res*, **22**, 859–862.
- 552 Bazarbachi A, Muakkat S, Ayas M, Taher A, Salem Z, Solh H and Haidar JH (1998) Thiamine-responsive myelodysplasia. *Br J Haematol*, **102**, 1098–1100.
- 553 Ferrari E, Ascari E, Bossolo PA and Barosi G (1976) Sheehan's syndrome with complete bone marrow aplasia: longterm results of substitution therapy with hormones. *Br J Haematol*, **33**, 575–582.
- 554 Srinivas U, Pillai LS, Kumar R, Pati HP and Saxena R (2007) Bone marrow aplasia-a rare complication of imatinib therapy in CML patients. *Am J Hematol*, **82**, 314–316.
- 555 Basser RL, O'Flaherty E, Green M, Edmonds M, Nichol J, Menchaca DM *et al.* (2002) Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood*, **99**, 2599–2602.
- 556 Resuke WH, Anderson C, Pastuszak WT, Conway SR and Firshein SI (1991) Arsenic intoxication presenting as a myelodysplastic syndrome: a case report. *Am J Hematol*, **36**, 291–293.
- 557 Case records of the Massachusetts General Hospital (1989) Case 33–1989. *N Engl J Med*, **321**, 454–463.
- 558 Millá F, Feliu E, Ribera JM, Junta J, Flores A, Vidal J *et al.* (1993) Electron microscopic identification of parvovirus virions in erythroid and granulocytic-line cells in a patient with human parvovirus B19 induced pancytopenia. *Leuk Lymphoma*, **10**, 483–487.
- 559 Harkess JR (1993) Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans. *Am J Hematol*, **30**, 265–266.
- 560 Gaines P, Thomas V, Fikrig E and Berliner N (2005) Infection with *Anaplasma phagocytophilum* inhibits proliferation and differentiation of myeloid

- progenitors: new insights into infection-related pancytopenia. *Blood*, **106**, 858a.
- 561 Al-Eissa YA, Assuhaimi SA, Al-Fawaz IM, Higgy KE, Al-Nasser MN and Al-Mobaireck KF (1993) Pancytopenia in children with brucellosis: clinical manifestations and bone marrow findings. *Acta Haematol*, **89**, 132–136.
- 562 Bilgrami S, Almeida GD, Quinn JJ, Tuck D, Bergstrom S, Dainiak N *et al.* (1994) Pancytopenia in allogeneic marrow transplant recipients: role of cytomegalovirus. *Br J Haematol*, **87**, 357–362.
- 563 Gompels UA, Luxton J, Knox KK and Carrigan DR (1994) Chronic bone marrow suppression in immunocompetent adult by human herpesvirus 6. *Lancet*, **343**, 735–736.
- 564 Thaunat O, Mamzer-Bruneel ME, Agbalika F, Valensi F, Venditto M, Lebbe C *et al.* (2006) Severe human herpesvirus-8 primary infection in a renal transplant patient successfully treated with anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood*, **107**, 3009–3010.
- 565 Silveira P, Esteves I, Assis R, Pires F, Alanna A, Colombini M *et al.* (2010) Toxoplasmosis as a cause of pancytopenia in immunosuppressed patients. *Haematologica*, **95**, Suppl. 2, 734.
- 566 Martinez E, Domingo P and Ruiz D (1991) Transient aplastic anaemia associated with legionnaires' disease. *Lancet*, **338**, 264.
- 567 Ozkan A, Ozkalemkas F, Ali R, Karadogan S, Ozkocaman V, Ozcelik T and Tunali A (2006) Mediterranean spotted fever: presentation with pancytopenia. *Am J Hematol*, **81**, 646–647.
- 568 Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK, Pittaluga S, Heslop HE, Rooney CM *et al.* (2011) Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: a 28-year experience in the United States. *Blood*, **117**, 5835–5849.
- 569 Hasle H, Kerndrup G, Jacobsen BB, Heegaard ED, Hornsleth A and Lillevang ST (1994) Chronic parvovirus infection mimicking myelodysplastic syndrome in a child with subclinical immunodeficiency. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **16**, 329–333.
- 570 Hoagland HC and Goldstein NP (1978) Hematologic (cytopenic) manifestations of Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Mayo Clin Proc*, **53**, 498–500.
- 571 Wiesneth M, Pflieger H, Frickhofen N and Heimpel H (1985) Idiopathic combined immunocytopenia. *Br J Haematol*, **61**, 339–348.
- 572 van der Werff ten Bosch J, Delabie J, Böhler T, Verschuere J and Thielemans K (1999) Revision of the diagnosis of T-zone lymphoma in the father of a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Br J Haematol*, **106**, 1045–1048.
- 573 Barrett AJ (1987) Graft-versus-host disease: a review. *J Roy Soc Med*, **80**, 368–373.
- 574 Bigorgne C, Le Tourneau A, Messing B, Rio B, Giraud V, Molina T *et al.* (1996) Sea-blue histiocyte syndrome in bone marrow secondary to total parenteral nutrition including fat-emulsion sources: a clinicopathologic study of seven cases. *Br J Haematol*, **95**, 258–262.
- 575 Talansky AL, Schulman P, Vinciguerra VP, Margouleff D, Budman DR and Degman TJ (1981) Pancytopenia complicating Graves' disease and drug-induced hypothyroidism (sic). *Arch Intern Med*, **141**, 544–545.
- 576 Ruocco L, Baldi N, Cecccone A, Marini A, Azzara A, Ambrogi F and Grassi B (1986) Severe pancytopenia due to copper deficiency. *Acta Haematol*, **76**, 224–226.
- 577 Lo L, Singer S and Vichinsky E (2002) Pancytopenia induced by hypothermia. *J Pediatr Hematol Oncol*, **24**, 681–684.
- 578 Murrin RJA and Harrison P (2004) Abnormal osteoclasts and bone marrow fibrosis in Paget's disease of bone. *Br J Haematol*, **124**, 3.
- 579 Lim D-J, Oh EJ, Park C-W, Kwon H-S, Hong E-J, Yoon K-H *et al.* (2007) Pancytopenia and secondary myelofibrosis could be induced by primary hyperparathyroidism. *Int J Lab Hematol*, **29**, 464–468.

CAPÍTULO 7

Exames complementares importantes

As células do sangue periférico podem ser examinadas por uma série de técnicas que complementam os dados obtidos pelo hemograma convencional: citoquímica, imunofenotipagem, citogenética, análise molecular genética e exame ultraestrutural por microscopia eletrônica. Somente serão discutidas neste capítulo as técnicas que se correlacionam às do hemograma, isto é, que envolvem contagens ou exames citológicos.

Técnicas citoquímicas

Algumas técnicas recomendadas para colorações citoquímicas estão listadas na Tabela 7.1. A coloração e a contagem de reticulócitos já foram discutidas no

TABELA 7.1 Alguns métodos recomendados de colorações citoquímicas

Procedimento	Método recomendado
Pesquisa de corpos de Heinz	Azul-de-rodanil com 2 minutos de incubação [1] ou metil-violeta
Pesquisa de hemoglobina H	Azul-brilhante-de-cresil, com 2 horas de incubação [1]
Células contendo hemoglobina F	Eluição ácida [1]
Reação de Perls para o ferro	Ferrocianeto de potássio [1]
Mieloperoxidase	p-Fenilenodiamina + catecol + H ₂ O ₂ [2]
Sudan black B (SBB)	Sudan black B [1]
Naftol AS-D cloroacetato esterase (CAE) (cloro-acetato esterase)	Naftol AS-D cloroacetato + fucsina hexazotizada [3] ou fast blue BB [4] ou Corinth V
α-Naftil acetato esterase	α-Naftil acetato + pararrosanilina hexazotizada [3] ou fast blue RR
Fosfatase alcalina nos leucócitos (LAP)	Naftol AS-MX fósforo + fast blue RR
Ácido periódico de Schiff (PAS)	Ácido periódico + reagente de Schiff [1]
Fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)	Naftol AS-BI fósforo + fast garnet GBC, com e sem ácido tartárico [5]

Reagentes adequados para exames citoquímicos podem ser adquiridos de Sigma-Aldrich.

Capítulo 2. As aplicações dos demais exames citoquímicos serão discutidas neste capítulo.

Corpos de Heinz

Corpos de Heinz são inclusões eritrocíticas compostas por hemoglobina desnaturada; podem ser percebidos como corpos refringentes em distensões secas não coradas, observadas com o condensador abaixado. A presença pode ser suspeitada por aspectos vistos na coloração de rotina com May-Grünwald-Giemsa (MGG). Corpos de Heinz coram-se por vários corantes vitais, incluindo metil-violeta, violeta-de-cresil, novo-azul-de-metileno, azul-brilhante-de-cresil, verde-brilhante e azul-de-rodanil. O formato e o tamanho característicos (Figura 7.1; ver também Tabela 2.3) ajudam a identificá-los. Corpos de Heinz não são vistos em eritrócitos de indivíduos normais, uma vez que são removidos pelos macrófagos do baço, em um processo conhecido como *pitting*. São vistos em pequeno número no sangue de indivíduos esplenectomizados. Após a exposição a

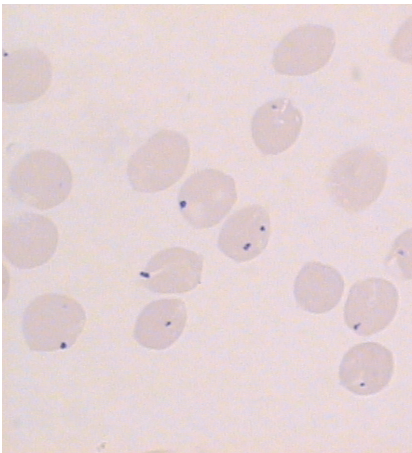


FIGURA 7.1 Preparação com metil-violeta mostrando corpos de Heinz em paciente exposto à droga oxidante dapsona. Cortesia do falecido Dr. Swirsky e do Sr. David Roper, Londres.

drogas oxidantes, são vistos em grande número, particularmente em indivíduos com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ou em indivíduos previamente esplenectomizados. Também são vistos em pacientes com hemoglobina instável, pós-esplenectomia. Em pacientes com hemoglobina instável, não esplenectomizados, têm presença irregular; em alguns pacientes, formam-se *in vitro* após incubação prolongada.

A coloração é indicada na suspeita de anemia hemolítica com corpos de Heinz. Algumas vezes, contudo, o diagnóstico é facilmente feito pela história clínica e pelo hemograma, e o teste torna-se desnecessário.

Inclusões de hemoglobina H

A hemoglobina H (uma hemoglobina anômala, sem cadeias α mas com um tetrâmero de cadeias β) é

desnaturada e corada pelos mesmos corantes vitais que coram reticulócitos. As inclusões regulares características, em “bola de golfe” (Figura 7.2a), levam mais tempo para aparecer do que o retículo do reticulócito; recomenda-se um período de incubação de 2 horas. É importante que se utilize novo-azul-de-metileno ou azul-brilhante-de-cresil para demonstrar as inclusões características. O azul-de-metileno (que já foi vendido por fabricantes sob a denominação incorreta de novo-azul-de-metileno) não cora da maneira típica [6]. Pacientes com hemoglobinopatia H, não esplenectomizados, mostram o aspecto característico de “bola de golfe”, ao passo que pacientes esplenectomizados apresentam, também, inclusões pré-formadas de hemoglobina H, semelhantes a corpos de Heinz (Figura 7.2b). Eritrócitos contendo hemoglobina H são facilmente detectados nos pacientes com hemoglobinopatia

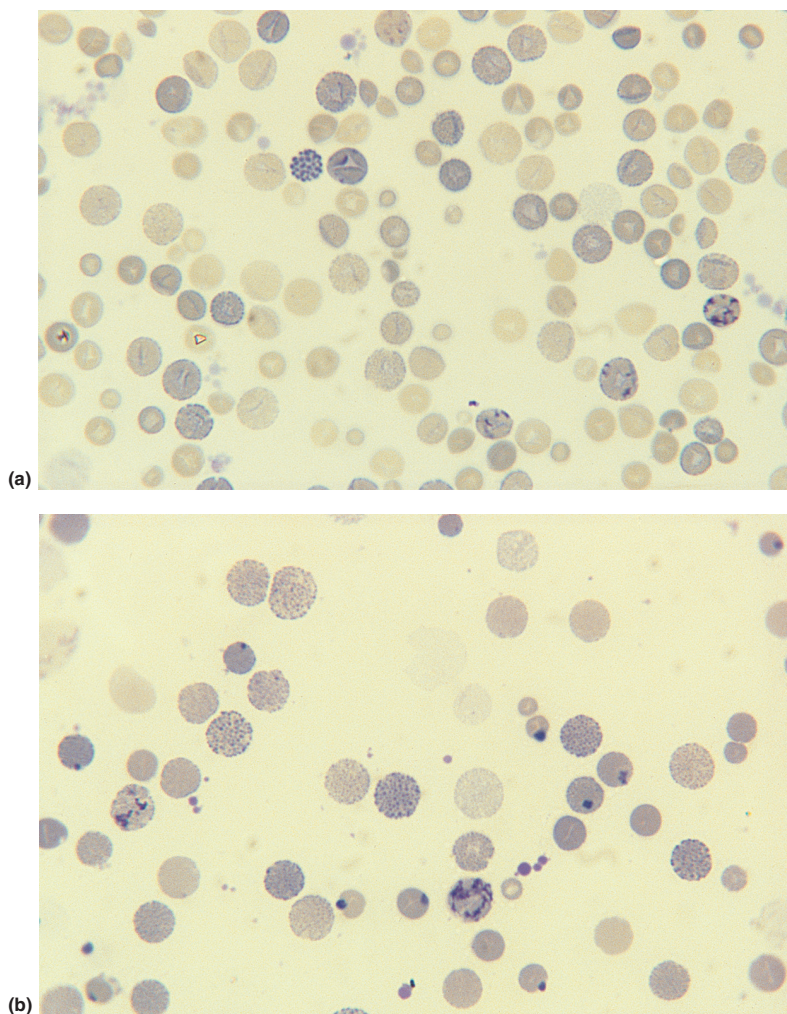


FIGURA 7.2 Preparações para a hemoglobina H mostrando: (a) eritrócitos contendo hemoglobina H (múltiplas inclusões pequenas, coradas em azul-pálido) e reticulócitos (com retículo purpúreo) em paciente com hemoglobinopatia H; e (b) eritrócitos contendo hemoglobina H, um reticulócito e corpos de Heinz (grandes inclusões azuis dispostas perifericamente) no sangue de um paciente com hemoglobinopatia H que havia sido esplenectomizado.

H, podendo constituir-se em maioria. Em pacientes com traço α -talassêmico, a frequência é da ordem de 1 para cada 1.000 eritrócitos (quando faltam dois dos quatro genes α) ou muito menor (quando falta apenas um dos quatro genes α); mesmo após longa pesquisa, nem sempre são detectados. Inclusões de hemoglobina H não existem em eritrócitos de pessoas hematologicamente normais, mas eritrócitos assemelhados podem raramente ser vistos; convém, por isso, incubar um sangue normal controle junto com o do paciente.

A identificação de ocasionais eritrócitos contendo hemoglobina H é de utilidade muito restrita no diagnóstico de traço α -talassêmico, pois a pesquisa dos raros eritrócitos com inclusões é exaustiva, e resultados falsos-negativos são comuns. Quando o diagnóstico é importante, como no caso de aconselhamento genético, deve-se recorrer à análise de DNA.

Eritrócitos contendo hemoglobina F

Eritrócitos que contêm hemoglobina F são identificados citoquimicamente pela resistência à eluição da hemoglobina em meio ácido (Figura 7.3); o procedimento é comumente denominado teste de Kleihauer, nome de seu idealizador, embora o método original de Kleihauer seja com frequência modificado. O teste é útil para a detecção de células fetais na circulação materna e, portanto, para detectar e quantificar hemorragia feto-materna. É indicado para mostrar essa via de perda sanguínea em casos de anemia neonatal a esclarecer e para quantificar a passagem de eritrócitos fetais Rh D-positivos para as mães Rh D-negativas. O teste de Kleihauer também

detecta células autólogas que contenham quantidades apreciáveis de hemoglobina F, como as vistas na persistência hereditária de hemoglobina fetal e β -talassemia, em alguns pacientes com talassemia maior, traço $\delta\beta$ -talassêmico, anemia de células falciformes, leucemia mielomonocítica crônica infantil, síndromes mielodisplásicas (SMDs) e algumas outras condições. A distribuição da hemoglobina F nos eritrócitos pode ser homogênea (em alguns tipos de persistência hereditária de hemoglobina fetal) ou heterogênea (em outros tipos de persistência hereditária de hemoglobina fetal e em outras condições). Além da amostra que está sendo investigada, devem ser feitos controles positivo e negativo; pode-se preparar um controle positivo misturando-se eritrócitos de adulto com eritrócitos fetais.

É importante notar que o teste de Kleihauer não pode ser usado para a detecção de eritrócitos fetais na circulação materna se o sangue materno tiver um teste positivo prévio, isto é, contiver nível alto de hemoglobina fetal.

Reação de Perls para ferro

A coloração de Perls baseia-se na reação entre o ferrocianeto ácido e o íon férrico (Fe^{3+}) da hemossiderina, com consequente formação de ferrocianeto férrico, que se cora em azul intenso (azul-da-Prússia). A ferritina, solúvel, não dá uma reação positiva. A coloração de Perls geralmente é feita em material da medula óssea, mas pode ser usado em distensões sanguíneas para detectar sideroblastos e siderócitos.

Em distensões sanguíneas coradas por corantes de Romanowsky, a hemossiderina aparece como

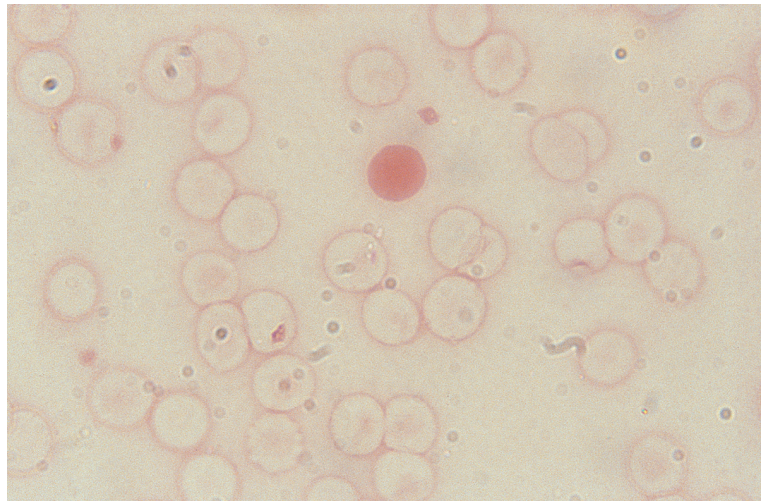


FIGURA 7.3 Técnica da eluição ácida (teste de Kleihauer) para eritrócitos com hemoglobina F; a amostra de sangue foi retirada de uma puerpera e mostra que ocorreu hemorragia feto-materna. É visto um único eritrócito fetal corado, contra um fundo de estromas de eritrócitos maternos.

pequenos grânulos azuis chamados corpúsculos de Pappenheimer (ver Capítulo 3). Quando usada a coloração de Perls, são denominados grânulos sideróticos ou siderossomas, e os eritrócitos que os contêm, siderócitos (Figura 7.4a). Siderócitos são raramente detectados no sangue de indivíduos normais; siderossomas estão presentes nos reticulócitos recém-liberados da medula óssea, mas desaparecem durante a maturação do reticulócito no baço, provavelmente porque a hemossiderina é utilizada para a síntese de mais hemoglobina. Quando indivíduos hematologicamente normais são esplenectomizados, um pequeno número de siderócitos é visto no sangue. Quando a medula óssea libera eritrócitos contendo grânulos sideróticos anormalmente grandes ou numerosos, como na anemia sideroblástica

ou na talassemia maior, muitas das inclusões anormais são removidas no baço; algumas continuam a ser detectáveis no sangue periférico, tanto em reticulócitos como em eritrócitos maduros. Se um paciente com defeito de incorporação do ferro for esplenectomizado ou por qualquer causa apresentar hipoesplenia, serão vistos no sangue siderócitos em grande número.

Eritroblastos que contêm grânulos sideróticos são ditos sideroblastos; estão normalmente presentes na medula óssea, mas, como eritrócitos nucleados em geral não circulam, raramente são vistos no sangue periférico. Quando aparecem, podem ser morfológicamente normais, contendo apenas um ou poucos grânulos finos, ou anormais, com grânulos de tamanho e/ou número aumentados. Dentre os sideroblastos anormais, são chamados “sideroblastos em anel” os que mostram um anel de grânulos sideróticos junto à membrana nuclear (Figura 7.4b). Quando há eritroblastos no sangue periférico, estes podem ser corados com a coloração de Perls para identificar e avaliar com segurança os grânulos sideróticos presentes. Sideroblastos anormais podem ser detectados no sangue periférico na anemia sideroblástica, na anemia megaloblástica e na talassemia maior; são vistos em grande número se o baço estiver ausente ou hipofuncionante. A anemia sideroblástica é em geral diagnosticada pela coloração de Perls em material aspirado da medula óssea, mas uma alta probabilidade diagnóstica já se obtém pela detecção de sideroblastos em anel no sangue periférico, se necessário, em preparação da camada de leucócitos (*buffy coat*), onde os eritroblastos se concentram.

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Uma coloração citoquímica para G6PD é útil na detecção de mulheres heterozigóticas para a deficiência [7]. Embora a dosagem da enzima possa estar normal, a citoquímica mostrará uma dupla população de eritrócitos, normal e deficiente.

Colorações citoquímicas usadas no diagnóstico e na classificação das leucemias

As colorações citoquímicas usadas no diagnóstico e na classificação das leucemias podem ser aplicadas tanto à medula óssea quanto ao sangue periférico. Examinam-se apenas as células do sangue periférico se a aspiração da medula óssea for difícil ou impossível. Como regra, o exame do sangue periférico e o da medula

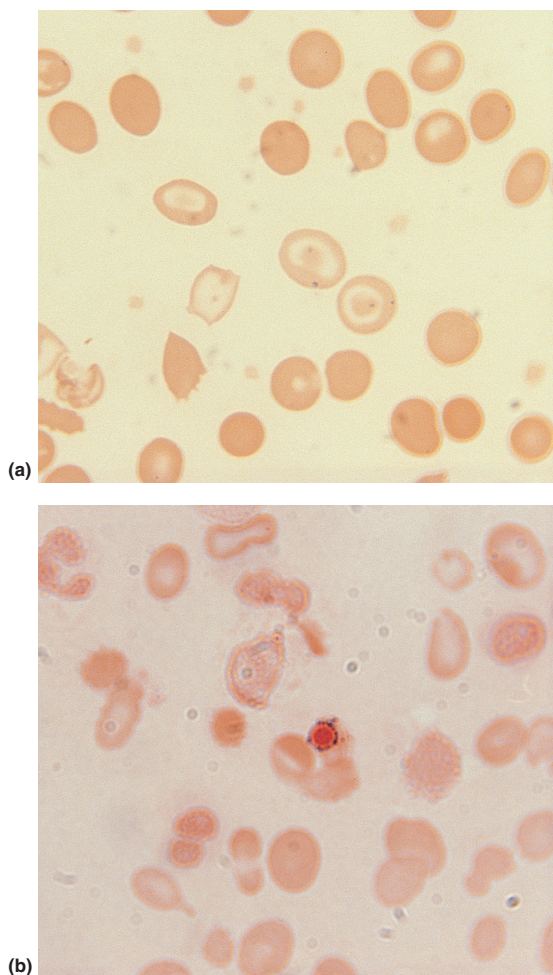


FIGURA 7.4 Coloração de Perls mostrando: (a) siderócitos (células contendo pontos azuis) no sangue de paciente com talassemia maior; e (b) sideroblasto em anel no sangue de paciente com anemia sideroblástica.

óssea complementam-se. A coloração citoquímica para a fosfatase alcalina dos neutrófilos é feita no sangue periférico. A citoquímica é atualmente muito menos usada no diagnóstico diferencial das leucemias, já que se difundiu o acesso à imunofenotipagem por citometria em fluxo; usa-se somente na falta desta. As colorações de mieloperoxidase ou Sudan black B (SBB) persistem úteis para identificação de bastões de Auer em células mieloides leucêmicas.

Fosfatase alcalina nos leucócitos (neutrófilos) (LAP)

Esta coloração é redundante se houver acesso a análises molecular ou citogenética para a detecção de *BCR-ABL1* ou *t(9;22)(q34;q11.2)*.

A fosfatase alcalina está presente nos neutrófilos maduros – mas não nos eosinófilos – em organelas citoplasmáticas específicas [8], chamadas vesículas secretórias ou fosfossomos. Apesar de não existir nos demais leucócitos, a designação “LAP” (*leukocyte alkaline phosphatase* [fosfatase alcalina leucocitária]) é tradicionalmente preferida a NAP (*neutrophil alkaline phosphatase*). Diversas colorações citoquímicas podem ser usadas para demonstrar a atividade da LAP. Uma coloração adequada é a recomendada por Ackerman [9], a qual possibilita a semiquantificação da atividade da fosfatase alcalina, como mostram a Tabela 7.2 e a Figura 7.5, por um escore LAP entre 0 e 400. Os limites de referência do escore LAP dependem do substrato usado; com esse método, é da ordem de 30 a 180. É preferível que o escore LAP seja determinado em sangue nativo ou heparinizado. A reação citoquímica deverá ser realizada no máximo 8 horas depois de obtida a amostra, mas, se isso não for possível, as distensões poderão ser fixadas e estocadas em local escuro, à temperatura ambiente. O sangue anticoagulado com EDTA, não é ideal, uma vez que a atividade enzimática é inibida; se, no entanto, houver necessidade de usá-lo, as distensões deverão ser feitas dentro de 10 a 20 minutos da coleta

da amostra; mesmo assim, haverá certa perda de atividade. Junto com a amostra do paciente, devem ser corados controles baixo, normal e alto. O controle baixo pode ser obtido de paciente com leucemia mieloide crônica (LMC) ou preparado por meio da imersão de uma lâmina de sangue normal, apropriadamente fixada, em água fervente durante 1 minuto. O controle alto pode ser obtido de paciente com infecção, ou de gestante ou puérpera, ou, ainda, de mulher que esteja usando anticoncepcionais orais. Distensões de sangue-controle, positivo e negativo, apropriadamente fixadas e envolvidas em filme de parafina, podem ser estocadas a –70°C durante pelo menos 1 ano.

Algumas causas de escores LAP altos e baixos são apresentadas na Tabela 7.3. A síntese do mRNA LAP é estimulada pelo fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) e inibida pelo fator estimulante de colônias granulocíticas e macrofágicas (GM-CSF), pela interleuquina-3 (IL-3) e pelo interferon; o baixo escore LAP notado em infecções virais pode refletir o efeito deste último.

Recém-nascidos têm escores LAP muito altos, em geral acima de 200; a diminuição para os níveis típicos da infância ocorre entre o quinto e o décimo meses de idade [15]. Bebês prematuros e com baixo peso ao nascimento têm escores mais baixos do que bebês a termo. Escores de crianças são mais altos do que de adultos e diminuem gradualmente para os níveis destes antes da puberdade [16]. Escores de mulheres na faixa etária reprodutiva são mais altos do que escores de homens e variam durante o ciclo menstrual (Figura 7.6). Após a menopausa, os escores femininos aproximam-se dos escores masculinos (Figura 7.7) [16, 17].

O escore LAP é baixo em 95% dos pacientes com LMC. O teste é útil para distinguir a LMC das outras síndromes mieloproliferativas crônicas, que costumam ter escore normal ou elevado, e para distinguir a LMC da neutrofilia reacional, pois nesta

TABELA 7.2 Escores de atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAP) (segundo Kaplow [10]); atribui-se escore a cada um de 100 neutrófilos, da seguinte forma

Escore da célula	Porcentagem de citoplasma ocupado pelo corante precipitado	Tamanho dos grânulos	Intensidade da coloração	Fundo citoplasmático
0	Nenhuma	–	Nenhuma	Incolor
1	50	Pequeno	Fraca a moderada	Incolor a azul muito pálido
2	50-80	Pequeno	Moderada a forte	Incolor a azul-pálido
3	80-100	Médio a grande	Forte	Incolor a azul
4	100	Médio e grande	Muito forte	Não visível

Após a atribuição de escore a cada um dos 100 neutrófilos examinados, multiplica-se cada escore pelo número de células com esse escore. O escore final da LAP é obtido somando-se os resultados.

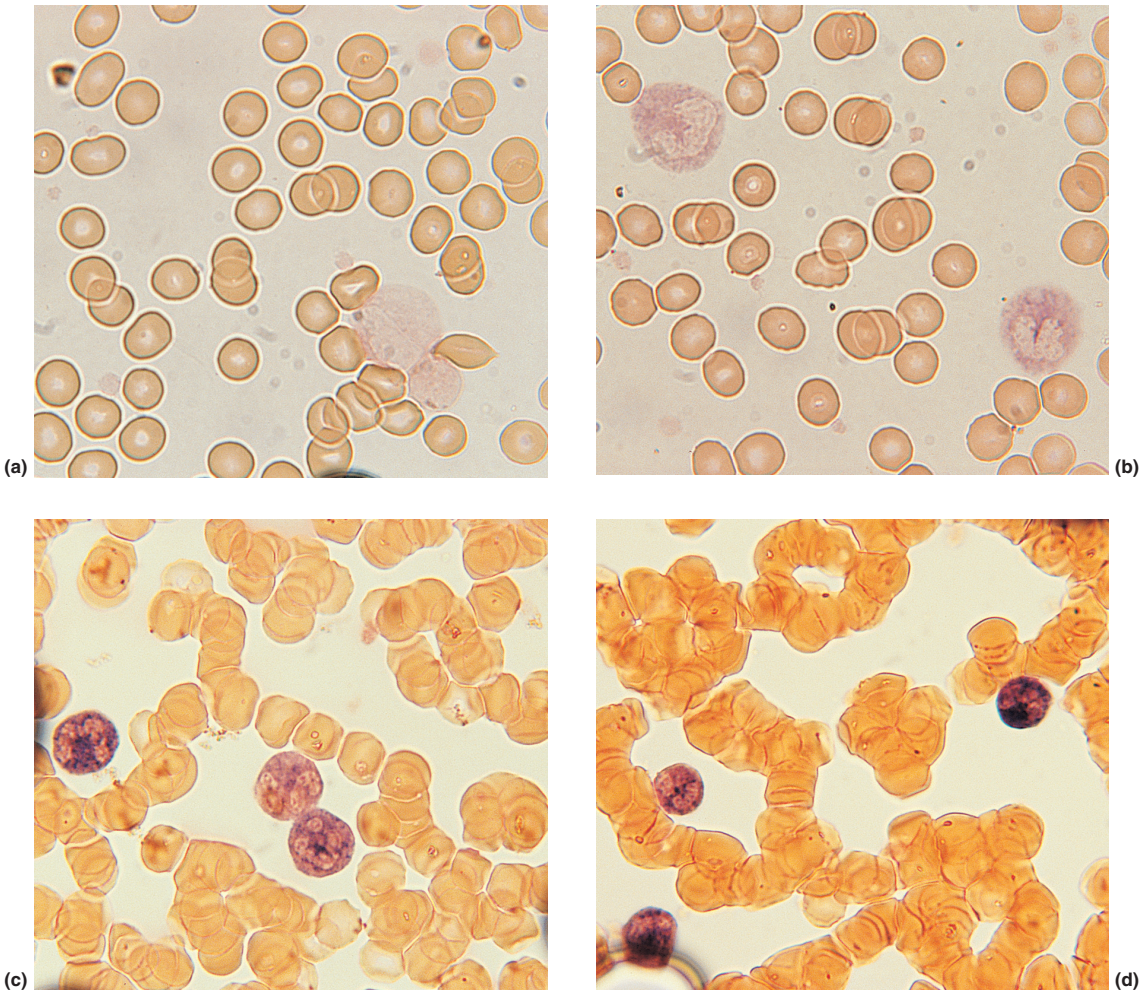


FIGURA 7.5 Reação da fosfatase alcalina leucocitária (LAP) (método de Ackerman [9]) mostrando células com reações de graus 0 a 4: (a) neutrófilo com escore 0 e um linfócito que também é negativo; (b) dois neutrófilos bastonados com escore 1; (c) dois neutrófilos com escore 2 e um com escore 3; e (d) dois neutrófilos com escore 4 e um com escore 2.

última quase sempre há escore alto. Em pacientes com LMC, a LAP pode aumentar e mostrar-se normal ou elevada na gravidez, depois de cirurgia (particularmente esplenectomia), durante infecção bacteriana, quando a medula se torna hipoplástica pela quimioterapia e após o início da transformação. Deve-se considerar, entretanto, que havendo acesso fácil a análises molecular ou citogenética, o escore LAP é redundante mesmo na investigação de casos suspeitos de LMC.

O escore LAP pode ser útil para distinguir policitemia vera, que apresenta um escore elevado, de poliglobulia secundária, na qual é mais provável que o escore seja normal. Considere-se, uma vez

mais, que havendo acesso à análise molecular para a mutação *JAK2*, a LAP torna-se redundante. No mieloma múltiplo, um escore LAP aumentado correlaciona-se com a atividade da doença.

Mieloperoxidase (MPO)

Peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de substratos pelo peróxido de hidrogênio. Os grânulos dos neutrófilos e dos eosinófilos contêm peroxidases, designadas peroxidase leucocitária ou mieloperoxidase (MPO). A demonstração da atividade da MPO é útil para estabelecer e confirmar o diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA), uma vez que os linfoblastos são uniformemente

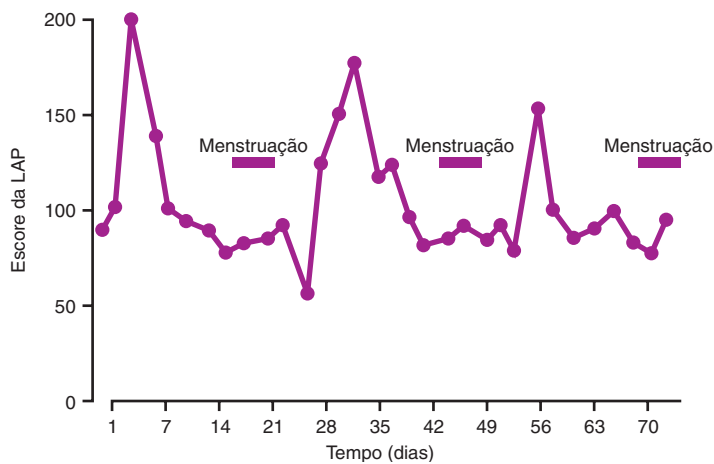


FIGURA 7.6 Alterações no escore da fosfatase alcalina leucocitária (LAP) durante o ciclo menstrual.

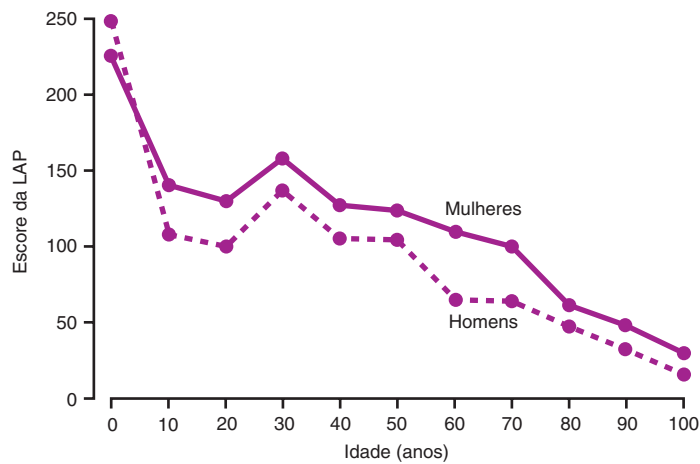


FIGURA 7.7 Alterações no escore da fosfatase alcalina leucocitária (LAP) com a idade, em homens e mulheres. Dados de Stavridis e colaboradores. [17].

peroxidase-positivos. Na linhagem monocítica, a atividade de peroxidase é detectada no estágio de promonócito. Monócitos e promonócitos têm menor número de grânulos peroxidase-positivos do que neutrófilos e seus precursores. Deficiência hereditária da peroxidase dos neutrófilos é comum. Também existem deficiências genéticas da peroxidase dos eosinófilos e dos monócitos.

Uma deficiência adquirida de peroxidase pode ocorrer na LMA e nas SMDs. Embora não se possa excluir que um paciente tenha leucemia linfoblástica aguda (LLA) e, por coincidência, deficiência congênita simultânea de peroxidase, a ocorrência de células

mieloides maduras peroxidase-negativas é evidência indireta de que uma leucemia, aparentemente indiferenciada, na verdade é LMA categoria FAB M0.

Deve-se notar que, quando um laboratório usa um contador eletrônico com citoquímica para peroxidase, como as séries Siemens H.1 e Advia, o gráfico de dispersão pode ser útil para detectar a atividade de peroxidase em blastos e a deficiência em neutrófilos.

Sudan black B (SBB)

O SBB (Figura 7.9) tem afinidade pelos grânulos dos polimorfonucleares e dos monócitos. Em geral,

FIGURA 7.8 Células blásticas leucêmicas coradas pela técnica de Hanker [2] para a mieloperoxidase mostrando um depósito preto-acastanhado no citoplasma, em caso de leucemia mieloide aguda FAB M2.

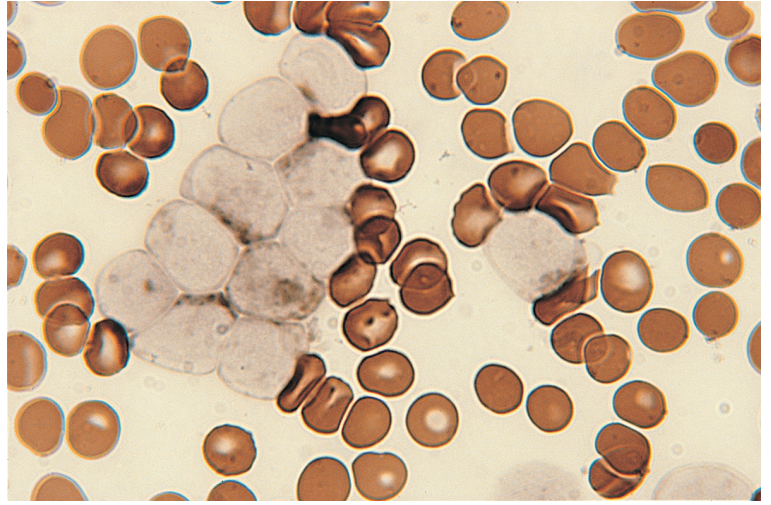
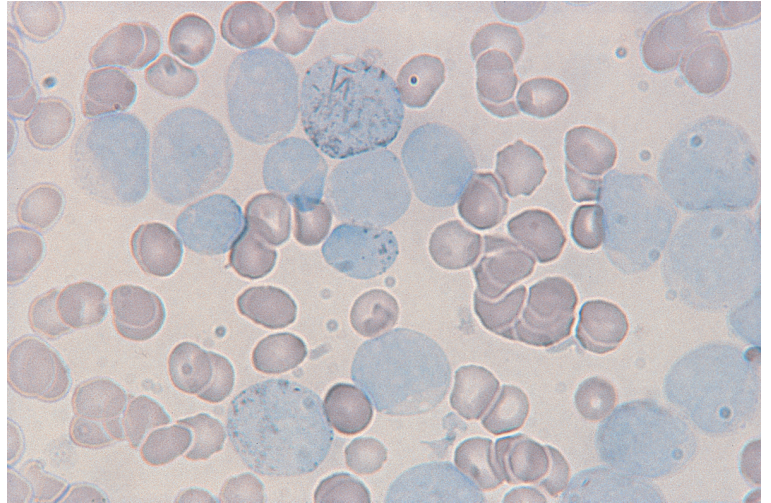


FIGURA 7.9 Células blásticas leucêmicas coradas com o Sudan Black B. Um blasto grande contém tanto grânulos como bastões de Auer. Vários outros blastos contêm grânulos. As células deste caso, leucemia mieloide aguda FAB M1, tinham pouquíssimos grânulos e apenas raros bastões de Auer visíveis na distensão corada pelo May-Grünwald-Giemsa.



a intensidade da reação de coloração positiva equipara-se à atividade da MPO. A coloração com o SBB é ligeiramente mais sensível do que a de MPO na detecção de mieloblastos. O SBB cora os grânulos dos neutrófilos (tanto os primários quanto os específicos), os grânulos específicos dos eosinófilos e, de modo variável, os grânulos específicos dos basófilos. A coloração dos grânulos dos eosinófilos pode ser periférica, permanecendo o centro não corado. Bastões de Auer são corados. Monoblastos são negativos ou mostram alguns grânulos pequenos SBB-positivos. Promonócitos e monócitos apresentam um número variável de

finos grânulos positivos. Em deficiências hereditárias de peroxidase de neutrófilos, de eosinófilos e de monócitos, os grânulos das células das linhagens deficitárias são SBB-negativos. Linfoblastos podem ter finos pontos positivos ocasionais, que podem representar mitocôndrias [4]. Muito raramente, é vista uma reação mais forte em linfoblastos de LLA [18], ou em células linfomatosas de linhagens T ou B [19].

Colorações MPO e SBB podem ser usadas não só para demonstrar que uma leucemia aparentemente indiferenciada é mieloide, mas também para sugerir evidência de displasia granulocítica quando

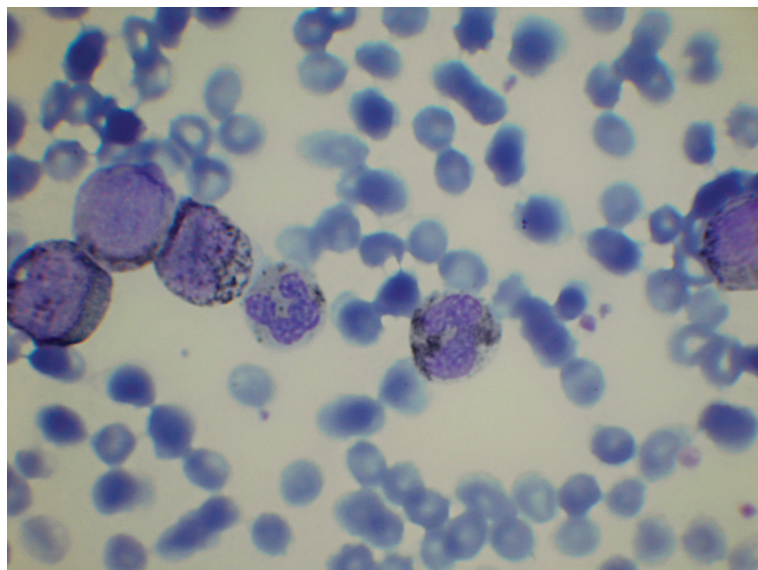


FIGURA 7.10 Distensão sanguínea corada com Sudan Black B (SBB), de paciente com leucemia mieloide aguda, mostrando dois blastos positivos. A presença de um neutrófilo parcialmente SBB negativo demonstra maturação neutrofílica displásica.

os neutrófilos maduros se mostram negativos [20] (Figura 7.10). Na prática, as duas colorações se equivalem e um laboratório pode escolher e fazer apenas uma delas.

Naftol AS-D cloroacetato esterase

Evidencia-se atividade de naftol AS-D cloroacetato esterase (“cloroacetato esterase”, CAE) nos neutrófilos e seus precursores (Figura 7.11) e nos mastócitos. Bastões de Auer às vezes são positivos; deve-se preferir sempre SBB ou MPO para detectá-los.

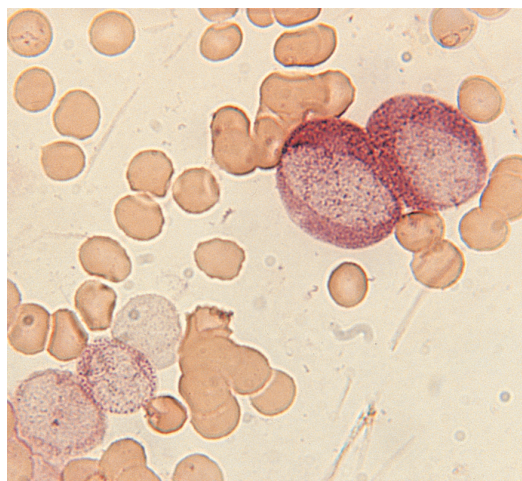


FIGURA 7.11 Células blásticas leucêmicas coradas com Cornin V para demonstrar a atividade de cloroacetato esterase (CAE), em caso de leucemia mieloide aguda FAB M2.

Eosinófilos e basófilos normais são negativos, mas os eosinófilos de certos tipos de leucemia eosinofílica podem ser positivos. Monócitos geralmente são negativos, mas podem mostrar reatividade fraca. A CAE é em geral menos sensível do que a MPO e o SBB na detecção de mieloblastos, embora já tenham sido observados casos positivos para a CAE, apesar de MPO-negativos [3, 4].

Esterases não específicas

A atividade de esterase é comum nas células hematopoéticas. Demonstrou-se a existência de 9 isoenzimas, 4 das quais responsáveis pela atividade cloroacetato esterase dos neutrófilos. Cinco, com atividade denominada esterase “não específica”, são encontradas em monócitos e em diversas outras células [4, 21]. Diferentes isoenzimas são preferencialmente detectadas por substratos distintos e em pHs diferentes. A reação citoquímica mais útil para detectar a atividade esterásica dos monócitos é a atividade de α -naftil acetato esterase (ANAE), em pH ácido (Figura 7.12). A atividade de α -naftil butirato esterase (ANBE) é muito parecida. Com a ANAE, obtêm-se reações fortemente positivas em monócitos e seus precursores, em megacariócitos e em plaquetas; plasmócitos apresentam reações mais fracas. A ANBE é mais frequentemente negativa em megacariócitos e plaquetas do que a ANAE. A atividade de esterase não específica dos monócitos e megacariócitos também pode ser detectada como atividade de naftol AS-D acetato (NASDA) esterase

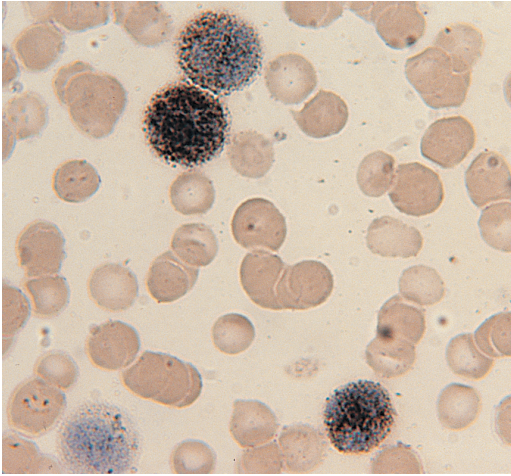


FIGURA 7.12 Células blásticas leucêmicas coradas com *fast* RR para demonstrar a atividade de α -naftil acetato esterase (ANAE) em caso de leucemia mieloide aguda FAB M5.

ou como a similar naftol AS acetato (NASA) esterase. A NASDA esterase é fracamente positiva em neutrófilos e seus precursores, sendo, portanto, menos adequada do que a ANAE para diferenciar a linhagem monocítica da linhagem neutrofílica. Pode-se melhorar a especificidade do teste fazendo a reação com e sem fluoreto, pois as enzimas dos monócitos e dos megacariócitos são inibidas pelo fluoreto, ao passo que a enzima dos neutrófilos é fluoreto-resistente. A atividade de ANAE dos monócitos e dos megacariócitos também é sensível ao fluoreto, mas a ANAE permite uma diferenciação mais clara entre monócitos e neutrófilos, não sendo necessária a adição de fluoreto. Atividade de esterase não específica é frequentemente evidenciada em linfócitos T normais e em leucemias agudas e crônicas de linhagem T. Com ANAE, nota-se, com frequência, um pontilhado positivo característico em células de LLA de linhagem T e de leucemia prolinfocítica T; para esse fim, a ANAE é superior à NASDA esterase [15], mas esse uso da citoquímica de esterases tornou-se redundante, substituído pela atual ampla disponibilidade da imunofenotipagem. Os eritroblastos anormais da eritroleucemia e da anemia megaloblástica também podem ter atividade de esterase não específica.

Esterase combinada

Uma reação combinada para as atividades da ANAE e da CAE permite que ambas as reações sejam estudadas em uma mesma distensão sanguínea, o que é

útil na caracterização rápida de leucemias agudas. A diferenciação monocítica e granulocítica da LMA FAB M4 (mielomonocítica) é claramente vista. Na presença de blastos aparentemente indiferenciados, a positividade simultânea para CAE e esterase não específica em $> 3\%$ é evidência de SMD; em um caso relatado, essa positividade comprovou que uma leucemia aparentemente indiferenciada era, na verdade, uma LMA FAB M0 [22].

Reação do ácido periódico de Schiff (PAS)

A reação do PAS cora diversos carboidratos, incluindo o glicogênio, frequentemente encontrado em células hematopoéticas. A principal aplicação clínica da coloração é no diagnóstico diferencial das leucemias agudas, mas seu papel tem diminuído consideravelmente com o uso crescente da imunofenotipagem. Linfoblastos de LLA, na grande maioria dos casos, são PAS-positivos; a positividade costuma apresentar-se sob forma de grânulos grosseiros ou de grandes blocos, em um fundo claro (Figura 7.13). Uma reação PAS-negativa é mais frequente na LLA de linhagem T do que na de linhagem B. Mieloblastos e monoblastos podem ser PAS-negativos, ou apresentar leve positividade, difusa ou granular. A positividade em blocos é rara na LMA, mas já foi observada em precursores de basófilos, bem como em monoblastos, megacarioblastos e eritroblastos.

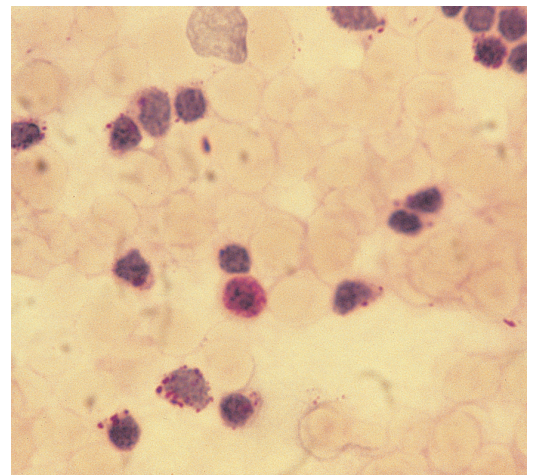


FIGURA 7.13 Reação do ácido periódico de Schiff (PAS) mostrando positividade em bloco nas células blásticas de um caso de LLA de linhagem B, FAB L1. Cortesia do Dr. Ayed Eden, Southend-on-Sea.

Muitas outras células hematopoéticas são PAS-positivas, mas a reação raramente tem importância diagnóstica. Ela tem aplicação limitada no diagnóstico de eritroleucemias, de leucemia megacarioblástica e de leucemia promielocítica aguda. Plaquetas, megacariócitos e os megacarioblastos mais maduros são positivos. Megacarioblastos podem apresentar grânulos PAS-positivos no interior de protrusões citoplasmáticas (*blebs*). Eritroblastos normais são PAS-negativos. Uma forte positividade PAS dos eritroblastos, difusa ou em bloco, pode ser vista na eritroleucemia; reações muito fortes, difusas ou granulares, também podem ser vistas na talassemia maior e na deficiência de ferro, e reações mais fracas, na anemia sideroblástica, na anemia hemolítica severa e em diversos outros distúrbios da eritropoese. Na leucemia promielocítica aguda, há positividade moderadamente intensa, notada como um tom rosado citoplasmático. Neutrófilos maduros têm finos grânulos positivos, que parecem encher o citoplasma, ao passo que eosinófilos e basófilos têm uma reação citoplasmática positiva, contrastando com os grânulos negativos. A maioria dos linfócitos normais é PAS-negativa. Linfócitos contendo grânulos PAS-positivos são mais numerosos nas linfocitoses reacionais, como a mononucleose infecciosa e outras infecções virais, e nos distúrbios linfoproliferativos, como a leucemia linfocítica crônica (LLC) e os linfomas não Hodgkin. Nas células de Sézary, pode haver um círculo de grânulos PAS-positivos circundando o núcleo, semelhante às contas de um rosário.

A coloração com PAS pode ser feita em distensões previamente coradas com corantes de Romanowsky.

Fosfatase ácida

Demonstra-se atividade de fosfatase ácida em várias células hematopoéticas. As duas principais aplicações dessa reação são no diagnóstico de tricoleucemia (*hairy cell leukemia*) e no de leucemias da linhagem T, particularmente a LLA de linhagem T.

A atividade de fosfatase ácida geralmente é mais forte nas leucemias agudas e crônicas de linhagem T do que nas de linhagem B, nas quais é frequentemente negativa. A LLA de linhagem T costuma mostrar positividade focal (Figura 7.14), o que foi muito útil para a confirmação desse diagnóstico antes da generalização da imunofenotipagem. A atividade de fosfatase ácida também é demonstrável em granulócitos e seus precursores, na linhagem monocítica

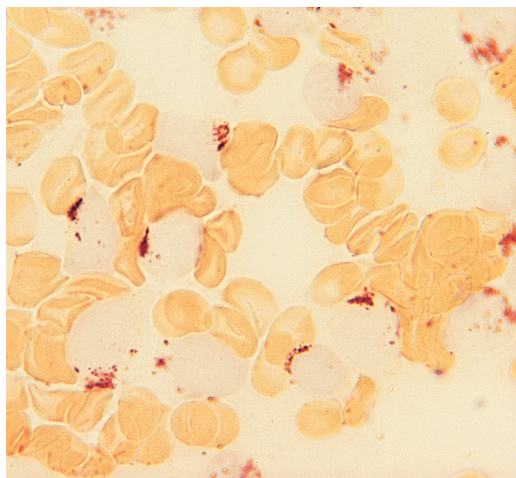


FIGURA 7.14 Coloração da fosfatase ácida pelo método de Janckila e colaboradores [5] mostrando positividade focal nas células blásticas de paciente com LLA de linhagem T.

e em plaquetas, megacariócitos e megacarioblastos mais maduros. Bastões de Auer são positivos.

Diversas isoenzimas da fosfatase ácida são encontradas nas células hematopoéticas. A fosfatase ácida das *hairy cells* é caracteristicamente resistente ao tartarato, ao passo que a de outras células é sensível à inibição pelo tartarato. A demonstração de atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é ainda importante nesse diagnóstico, está presente na grande maioria dos casos de tricoleucemia e é rara em outros distúrbios linfoproliferativos. Embora rara, a positividade TRAP já foi relatada em casos ocasionais de mononucleose infecciosa, de LLC, de leucemia prolinfocítica (LPL), de linfoma não Hodgkin e de síndrome de Sézary. Se forem disponíveis a imunofenotipagem para CD11c, CD25, CD103 e CD123 e a análise molecular para a mutação *BRAF1*, a reação TRAP é redundante. Os monócitos da doença de Gaucher também são TRAP-positivos, mas os monócitos normais, não [23].

Imunofenotipagem por citometria em fluxo

A imunofenotipagem por citometria em fluxo é atualmente de uso generalizado; utilizam-se anticorpos marcados diretamente com fluorocromos (Figura 7.15). A técnica permite análise simultânea da expressão de dois, três ou quatro antígenos,

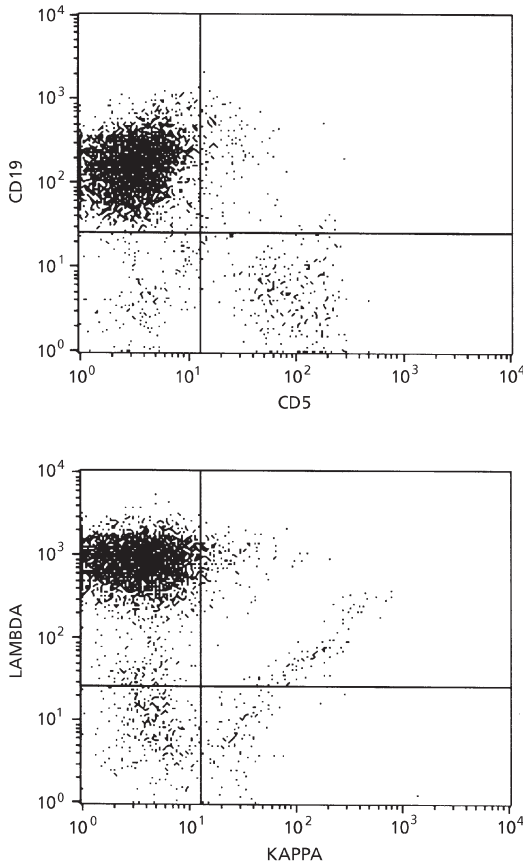


FIGURA 7.15 Imunofenotipagem por citometria de fluxo em um caso de linfoma folicular. O *plot* inferior demonstra clonalidade; as células são kappa-negativas e lambda-positivas e mostram forte expressão de imunoglobulina de superfície. O *plot* superior demonstra que as células linfomatosas são CD19+ e CD5-, diferenciando da leucemia linfocítica crônica e do linfoma de células do manto. Cortesia do Sr. Ricardo Morilla, Londres.

junto com uma avaliação da intensidade de expressão de cada um deles. Imunofenotipagem é empregada principalmente para caracterizar células neoplásicas de leucemias e linfomas, mas tem várias outras aplicações (Tabela 7.4). A imunofenotipagem por citometria de fluxo é fundamental no diagnóstico e subsequente classificação de leucemia e linfomas. É essencial para a confirmação do diagnóstico de LLA e de leucemias bifenotípicas agudas. Quando a leucemia aguda é obviamente mieloide, a imunofenotipagem é desnecessária, mas, no caso de falta de evidências de diferenciação mieloide (LMA FAB M0) e de diferenciação megacarioblástica

(LMA FAB M7), é essencial. Mesmo quando não é indispensável ao diagnóstico, a imunofenotipagem pode ser requerida para a inclusão de pacientes em protocolos de tratamento e para, estabelecendo-se o imunofenótipo, poder pesquisá-lo depois na monitoração de doença residual mínima.

É muitas vezes importante, também, para evitar erros diagnósticos nos distúrbios linfoproliferativos crônicos.

A imunofenotipagem de células neoplásicas em leucemias e linfomas é feita com um painel de anticorpos, principalmente monoclonais, que detectam antígenos na superfície da membrana, ou, se a célula for parcialmente fixada ou “permeabilizada”, também antígenos citoplasmáticos e nucleares. Com esses painéis pode-se vincular as células às linhagens T, B ou mieloide. Anticorpos específicos podem identificar células quanto à origem, se eritróide, megacariocítica e *natural killer* (NK). O emprego de um painel secundário de anticorpos permite identificação de perfis celulares característicos úteis na identificação dos tipos específicos de distúrbios linfoproliferativos. Achados imunofenotípicos característicos das neoplasias hematológicas são mostrados nas Tabelas 9.14 a 9.16. Para uma análise mais detalhada do uso de imunofenotipagem em neoplasias hematológicas, o leitor deve consultar a Referência 37.

Uma aplicação importante, mas especializada, da imunofenotipagem é a contagem de células pela expressão de um antígeno específico ou para evidenciar anormalidades antigênicas de células, como está resumido na Tabela 7.4.

Imunocitoquímica

Também pode ser feita imunofenotipagem de células fixadas, em distensões sanguíneas ou preparações de citocentrífuga, usando anticorpos detectados pela técnica da imunoperoxidase (Figura 7.16) ou da fosfatase alcalina – antifosfatase alcalina (*alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase – APAAP*) (Figura 7.17). Por meio dessas técnicas, são rapidamente detectados antígenos nucleares, citoplasmáticos e da membrana. A imunocitoquímica tem algumas vantagens em relação à citometria em fluxo, pois possibilita apreciar os demais aspectos morfológicos das células de coloração positiva, mas é tão trabalhosa que se tornou inapropriada para a rotina atual e está em desuso.

TABELA 7.4 Aplicações da imunofenotipagem de células por citometria em fluxo do sangue periférico*

Aplicações	Detalhes específicos
Imunofenotipagem de células anormais em casos suspeitos de leucemia ou linfoma – para diagnóstico e classificação e para estabelecimento de um fenótipo que permita monitorar a doença residual mínima	Ver Capítulo 9
Confirmação do aumento de células-tronco no sangue periférico, permitindo a colheita para transplante autólogo	Contagem de linfócitos CD34-positivos com fraca expressão de CD45 e baixa dispersão luminosa frontal e lateral
Deteccão de células tumorais não hematopoéticas circulantes para diagnóstico ou estadiamento	Deteccão de células de neuroblastoma pelos imunofenótipos CD81-positivo, CD56-positivo, CD45-negativo
Exclusão da presença de células carcinomatosas, células leucêmicas ou linfomatosas como contaminantes de colheita de células-tronco periféricas	Deteccão de células expressando citoqueratina ou antígenos aberrantes característicos de células de leucemia ou linfoma
Diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna [24]	Deteccão da falta de expressão de CD55 e CD59 por células sanguíneas periféricas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) ou falta de expressão de FLAER (<i>fluorescein-labelled proaerolysin</i>) em granulócitos, monócitos e plaquetas; CD16 e CD66b também estão diminuídos em neutrófilos
Diagnóstico de esferocitose hereditária	Redução da ligação de eosina-5-maleimida, que se liga especificamente à banda 3 da membrana do eritrócito [†] (ver Capítulo 8)
Deteccão e quantificação de hemorragia feto-materna [25]	Contagem de eritrócitos Rh-positivos em gestantes com alta hemoglobina F (o que invalida o teste de Kleihauer) e como alternativa ao teste de Kleihauer nas demais mulheres Deteccão de eritrócitos fetais por um anticorpo anti-hemoglobina F, distinguindo-a da hemoglobina F aumentada das células maternas pela potência do sinal Deteccão de eritrócitos fetais por citometria em fluxo com dupla cor, usando um anticorpo para hemoglobina F e um para o antígeno i; a expressão do antígeno i nos eritrócitos fetais com hemoglobina F distingue-os dos maternos com hemoglobina F; de modo similar, um anticorpo para anidrase carbônica pode ser usado junto com um anticorpo para hemoglobina F; a anidrase carbônica é fortemente expressa nos eritrócitos maternos contendo hemoglobina F e fracamente nos eritrócitos fetais [26]
Diagnóstico de defeitos plaquetários hereditários com redução ou ausência de glicoproteínas específicas, como trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier homo e heterozigótica, síndrome de Wiskott-Aldrich e trombocitopenia ligada ao sexo	Falta de expressão de glicoproteínas plaquetárias, como a glicoproteína IIb/IIIa na trombastenia de Glanzmann, a glicoproteína Ib/IX/V na síndrome de Bernard-Soulier e a proteína WAS na síndrome de Wiskott-Aldrich e nas síndromes relacionadas [27], falta de expressão do receptor de trombina, PAR1, falta de expressão dos receptores de colágeno Ia/IIa e VI
Diagnóstico da doença plaquetária de armazenamento	Conteúdo de serotonina plaquetária muito reduzida [28]
Diagnóstico da doença de adesão leucocitária	Falta de expressão de CD18 na doença tipo 1 e da expressão de CD15 na tipo 2
Deteccão de anormalidades plaquetárias adquiridas, como nas síndromes mielodisplásicas	Expressão anormal de antígenos ou variação inapropriadamente elevada ou baixa em resposta a agonistas plaquetários
Deteccão de plaquetas ativadas	Expressão de CD61P e neoepítopos na glicoproteína IIb/IIIa [29]
Monitoração de plaquetas transfundidas	Imunofluorescência com duas cores pode ser usada para medir a sobrevida de plaquetas transfundidas [30]
Diagnóstico e monitoração de imunodeficiência (congenita ou adquirida)	Contagem de linfócitos T, B e NK e análise das subpopulações apropriadas na suspeita de imunodeficiências congênicas ou adquiridas – deteção da falta de expressão de HLA-DR na “síndrome de linfócitos vazios”, deteção de falta de expressão de CD19 em alguns pacientes com agamaglobulinemia congênita; deteção da ativação de linfócitos e do aumento de expressão de TCR- $\gamma\delta$ na síndrome de Omenn e na imunodeficiência combinada severa com pega de enxerto materno-fetal; falta de expressão da tirosinoquinase de Bruton (Btk) em algumas plaquetas em mulheres portadoras de agamaglobulinemia ligada ao sexo; contagem de linfócitos CD4-positivos na avaliação inicial e na evolução da aids

(continua)

TABELA 7.4 Aplicações da imunofenotipagem por citometria em fluxo do sangue periférico* (Continuação)

Aplicações	Detalhes específicos
Diagnóstico da síndrome linfoproliferativa autoimune	Imunofenótipo característico: aumento de linfócitos T CD8-positivos e de linfócitos T CD8-positivos/CD57-positivos, aumento de linfócitos $\alpha\beta$ -positivos/CD4-negativos/CD8-negativos, aumento de linfócitos $\gamma\delta$ -positivos/CD4-negativos/CD-8 negativos, aumento de linfócitos T CD3-positivos/HLA-DR-positivos, diminuição de linfócitos T CD3-positivos/CD25-positivos e aumento de linfócitos B incluindo CD5-positivos [31]
Diagnóstico de linfo-histiocitose familiar hemofagocítica tipo 2	Falta de expressão de perforina pelos linfócitos CD8-positivos e CD56-positivos [32]
Diagnóstico da síndrome linfoproliferativa ligada ao sexo	Falta de expressão ou de proteína SAP [33] ou de proteína XIAP [34]
Deteção de antígenos de histocompatibilidade HLA-B27	Útil no suporte dos diagnósticos de espondilite anquilosante, síndrome de Reiter, artropatia psoriática e doença inflamatória intestinal
Monitoração de linfócitos T e deteção de linfócitos T sensibilizados a um antígeno	Monitoração de subpopulações de linfócitos T após transplante ou tratamento imunossupressivo; deteção de linfócitos T antígeno-específicos pela expressão do marcador de ativação CD69 após exposição ao antígeno
Quantificação de CD46 em granulócitos	Deteção de uma forma atípica de síndrome urémico-hemolítica [35]
Quantificação do grau de parasitemia na malária	Quantificação da porcentagem de eritrócitos parasitados e multiparasitados na malária por <i>Plasmodium falciparum</i> [36]

*O papel da imunofenotipagem é maior quando também são examinadas células da medula óssea, como na monitoração de doença residual mínima, no estabelecimento de clonalidade de plasmócitos com anticorpos anti- κ e anti- λ ou na confirmação do diagnóstico de mastocitose pela demonstração de mastócitos CD117-positivos que expressam CD2 e CD25.

*Este teste não usa anticorpos, mas permite, da mesma forma, a identificação de uma estrutura antigênica específica na membrana eritrocítica.

Análise citogenética

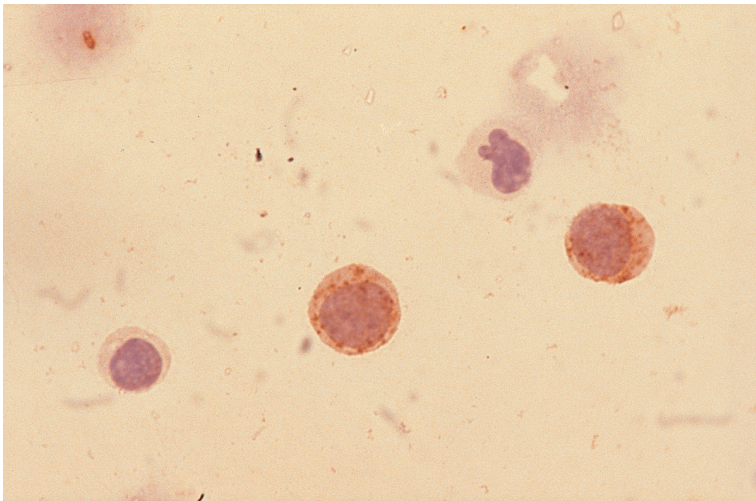
Células do sangue periférico podem ser usadas para análise citogenética na identificação de doenças genéticas e na investigação de leucemias e linfomas.

Na investigação de anomalias genéticas (p. ex., a síndrome de Down), linfócitos do sangue são estimulados com fito-hemaglutinina (PHA) para entrar

em mitose e prover metáfases próprias ao exame. Técnicas citogenéticas também podem ser aplicadas ao diagnóstico da anemia de Fanconi, pesquisando a suscetibilidade a agentes indutores de fragmentação cromossômica (clastogênicos).

Na investigação de leucemias e linfomas, o material obtido da medula óssea é geralmente o mais adequado à análise, mas resultados satisfatórios

FIGURA 7.16 Imunofenotipagem usando um anticorpo monoclonal para CD13 e a técnica da imunoperoxidase. As células blásticas deste caso mostraram reações negativas com a MPO, o SBB e a CAE, mas foram identificadas como mieloides (FAB M0) pela positividade com o CD13 e pela negatividade com anticorpos monoclonais dirigidos para antígenos linfoides. Cortesia do Professor Daniel Catovsky, Londres.



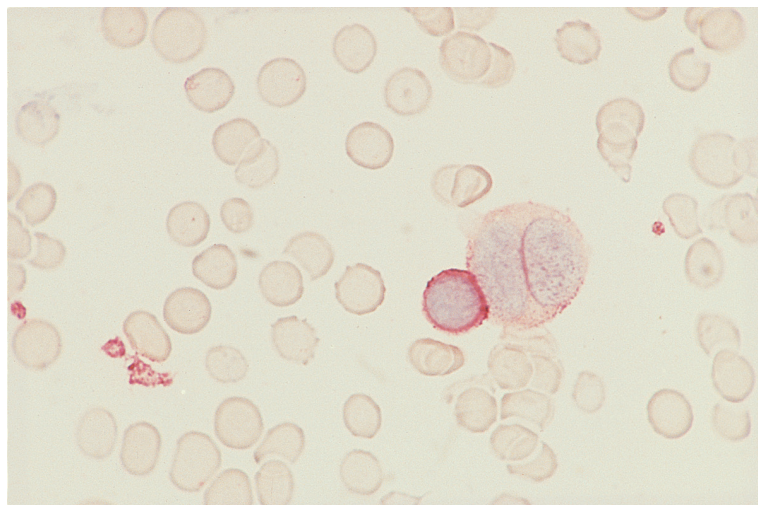


FIGURA 7.17 Imunofenotipagem usando um anticorpo monoclonal para CD42 (antiglicoproteína plaquetária Ib) e a técnica da fosfatase alcalina-antifosfatase alcalina (APAAP). Duas plaquetas, um micromegacariócito do tamanho de um linfócito e um megacariócito hipobulbado maior mostram reações positivas.

podem eventualmente ser obtidos pela análise citogenética do sangue periférico, como no caso de leucemias agudas com alta contagem de blastos ou em distúrbios linfoproliferativos de linhagens B e T, empregando-se mitogênicos para células B e T, respectivamente.

Para uma análise detalhada do papel da citogenética nas neoplasias hematológicas, é recomendada a Referência 37.

Hibridização com fluorescência *in situ*

O acrônimo “FISH” (do inglês *fluorescence in situ hybridisation*) é internacionalmente usado para denominar a técnica. A FISH pode ser feita em células do sangue periférico. As aplicações incluem a detecção de anormalidades típicas de neoplasias hematológicas, por exemplo, fusão *PML-RARA* na leucemia promielocítica aguda ou fusão *FIP1L1-PDGFR* na leucemia eosinofílica crônica. FISH também pode ser usada para detecção rápida de anormalidades constitucionais como trissomia 18 e trissomia 21.

Análise genética molecular

Células sanguíneas periféricas são usadas para análise genética molecular com três principais finalidades: (i) para demonstrar clonalidade (e, por implicação, neoplasia) pela demonstração dos genes de rearranjo clonal do receptor dos linfócitos T e dos

genes de imunoglobulina; (ii) para demonstrar a presença de vários rearranjos de oncogenes que se associam com neoplasias específicas da hematopoese (por exemplo, *BCR-ABL1* pode ser usado para monitorar a resposta no tratamento de LMC, e fusão *FIP1L1-PDGFR*, para identificar um dos tipos específicos de leucemia eosinofílica; e (iii) para demonstrar anomalias de genes herdadas, por exemplo, dos genes α e β da globina, que causam anormalidades hematológicas.

Técnicas de diagnóstico molecular incluem a análise por *Southern blot*, reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização genômica comparativa para a análise do DNA, e a transcriptase reversa-PCR (RT-PCR), para a investigação do RNA. PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR) pode ser usada para quantificar o produto de um gene de fusão em uma neoplasia hematológica. Para mais detalhes sobre os princípios e as aplicações dessas técnicas, são recomendadas as Referências 37 a 39.

Exame ultraestrutural

O exame ultraestrutural de células do sangue periférico por microscopia eletrônica é trabalhoso e, por isso, pouco empregado no diagnóstico hematológico de rotina. O microscópio eletrônico de varredura foi útil para demonstrar o formato real dos vários tipos de eritrócitos anormais vistos em distensões fixadas e coradas (ver Capítulo 3). A microscopia eletrônica de transmissão foi usada no passado na identificação da linhagem de células neoplásicas (p.

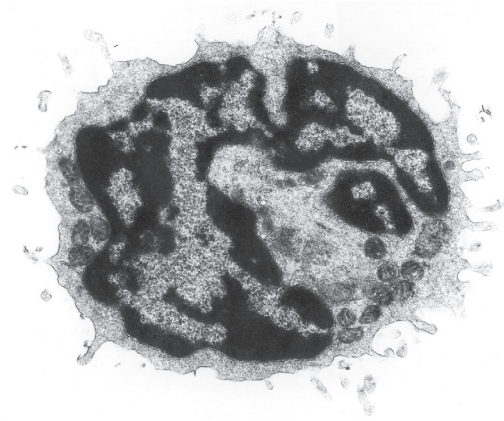


FIGURA 7.18 Exame ultraestrutural mostrando uma célula de Sézary com contorno nuclear muito irregular. Cortesia da Dra. Estella Matutes, Barcelona.

ex., megacarioblastos e mieloblastos) e na detecção de células de Sézary pelo aspecto nuclear característico (Figura 7.18), mas a técnica atualmente é redundante. Persiste útil para a distinção entre as várias síndromes de trombocitopenia congênita resultantes de mutação do gene *MYH9* e para identificar as que não se acompanham de inclusões leucocitárias visíveis à microscopia óptica.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o [website](http://www.wiley.com/go/bain/bloodcells), em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências

- Bain BJ and Swirsky D (2012) Erythrocyte and leucocyte cytochemistry. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA and Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Hanker JS, Yates PE, Metz CB and Rustioni A (1977) A new, specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem J*, **9**, 789–792.
- Yam LT, Li CY and Crosby WH (1971) Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol*, **55**, 283–290.
- Hayhoe FGJ and Quaglini D (1980) *Haematological Cytochemistry*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Janckila A, Li C-Y, Lam K-W and Yam LT (1978) The cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase technical considerations. *Am J Clin Pathol*, **70**, 45–55.
- Gadson D, Hughes M, Dean A and Wickramasinghe SN (1986) Morphology of redox-dye-treated HbH-containing red cells: confusion caused by wrongly identified dyes. *Clin Lab Haematol*, **8**, 365–366.
- Roper D and Layton M (2012) Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA and Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rustin GJS, Wilson PD and Peters TJ (1979) Studies on the subcellular localization of human neutrophil alkaline phosphatase. *J Cell Sci*, **36**, 401–412.
- Ackerman GA (1962) Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leucocyte alkaline phosphatase activity. *Lab Invest*, **11**, 563–567.
- Kaplow LS (1968) Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: applications and methods. *Ann NY Acad Sci*, **155**, 911–947.
- Breton-Gorius J, Mason DY, Buriot D, Vilde J-L and Griscelli C (1980) Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from patient with recurrent infections. *Am J Pathol*, **99**, 413–419.
- Repine JE, Clawson CC and Brunning D (1976) Primary leucocyte alkaline phosphatase deficiency in an adult with repeated infections. *Br J Haematol*, **34**, 87–94.
- Drouin A, Favier R, Massé J-M, Debili N, Schmitt A, Elbin C *et al.* (2001) Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood*, **98**, 1382–1391.
- Kohmura K, Miyakawa Y, Kameyama K, Kizaki M and Ikeda Y (2004) Granulocyte colony stimulating factor-producing multiple myeloma associated with neutrophilia. *Leuk Lymphoma*, **45**, 1475–1479.
- O’Kell RT (1968) Leukocyte alkaline phosphatase activity in the infant. *Ann NY Acad Sci*, **155**, 980–982.
- Rosner F, Lee SL, Schultz FS and Gorfien PC (1968) The regulation of leukocyte alkaline phosphatase. *Ann NY Acad Sci*, **155**, 902–910.
- Stavridis J, Creatas G, Lolis D, Traga G, Antonopoulos M and Kaskarelis D (1981) Relationships between leucocyte alkaline phosphatase and nitroblue tetrazolium reduction activities in the peripheral blood polymorphonuclear leucocytes in normal individuals. *Br J Haematol*, **47**, 157–159.
- Stein P, Peiper S, Butler D, Melvin S, Williams D and Stass S (1983) Granular acute lymphoblastic leukaemia. *Am J Clin Pathol*, **79**, 426–430.
- Savage RA, Fishleder J and Tubbs SRR (1983) Confirming myeloid differentiation. *Am J Clin Pathol*, **80**, 412.
- Bain BJ (2010) Neutrophil dysplasia demonstrated on Sudan black B staining. *Am J Hematol*, **85**, 707.
- Catovsky D (1980) Leucocyte enzymes in leukaemia. In: S’Roath (ed.) *Topical Reviews in Haematology*, Vol. 1. John Wright, Bristol.
- Elghetany MT (1999) Double esterase staining of the bone marrow contributes to lineage identification in a case of minimally differentiated acute

- myeloid leukaemia (AML M0). *Clin Lab Haematol*, **21**, 293–295.
- 23 Beutler E (1988) Gaucher disease. *Blood Rev*, **2**, 59–70.
 - 24 Brodsky RA (2008) Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev*, **22**, 65–74.
 - 25 Gomez-Arbonés X, Pinacho A, Ortiz P, Maciá J, Gallart M, Araguás C *et al.* (2002) Quantification of foetomaternal haemorrhage. An analysis of two cytometric techniques and a semi-quantitative gel agglutination test. *Clin Lab Haematol*, **24**, 47–53.
 - 26 Merz WM, Patzwaldt F, Fimmers R, Stoffel-Wagner B and Gembruch U (2012) Dual-colour flow cytometry for the analysis of fetomaternal haemorrhage during delivery. *J Clin Pathol*, **65**, 186–187.
 - 27 Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, Gresele P, Iolascon A, Pulcinelli FM and Savoia A (2003) Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*, **89**, 325–329.
 - 28 Maurer-Spurej E, Pittendreigh C and Wu JK (2007) Diagnosing platelet delta-storage pool disease in children by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*, **127**, 626–632.
 - 29 Roshan TM, Normah J, Rehman A and Naing L (2005) Effect of menopause on platelet activation markers determined by flow cytometry. *Am J Hematol*, **80**, 257–261.
 - 30 Hughes DL, Evans G, Metcalfe P, Goodall AH and Williamson LM (2005) Tracking and characterisation of transfused platelets by two colour, whole blood flow cytometry. *Br J Haematol*, **130**, 791–794.
 - 31 Bleesing JJH, Brown MR, Straus SE, Dale JK, Siegel RM, Johnson M *et al.* (2001) Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, **98**, 2466–2473.
 - 32 Suga N, Takada H, Nomura A, Ohga S, Ishii E, Ihara K *et al.* (2002) Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br J Haematol*, **116**, 346–349.
 - 33 Tabata Y, Villanueva J, Lee SM, Zhang K, Kanegane H, Miyawaki T *et al.* (2005) Rapid detection of intracellular SH2D1A protein in cytotoxic lymphocytes from patients with X-linked lymphoproliferative disease and their Family members. *Blood*, **105**, 3066–3071.
 - 34 Marsh RA, Villanueva J, Zhang K, Snow AL, Su HC, Madden L *et al.* (2009) A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. *Cytometry B Clin Cytom*, **76**, 334–344.
 - 35 Taylor CM, Machin S, Wigmore SJ and Goodship TH; working party from the Renal Association, the British Committee for Standards in Haematology and the British Transplantation Society (2010) Clinical practice guidelines for the management of atypical haemolytic uraemic syndrome in the United Kingdom. *Br J Haematol*, **148**, 37–47.
 - 36 Bei AK, Desimone TM, Badiane AS, Ahouidi AD, Di-eye T, Ndiaye D *et al.* (2010) A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. *Am J Hematol*, **85**, 234–237.
 - 37 Bain BJ (2010) *Leukaemia Diagnosis*, 4th edn. Wiley–Blackwell, Oxford.
 - 38 Bain BJ, Clarke DAC and Wilkins BS (2010) *Bone Marrow Pathology*, 4th edn. Wiley–Blackwell, Oxford.
 - 39 Bain BJ (2005) *Haemoglobinopathy Diagnosis*, 2nd edn. Blackwell Publishing, Oxford.

CAPÍTULO 8

Distúrbios dos eritrócitos e das plaquetas

Distúrbios dos eritrócitos

Distúrbios eritrocíticos são em geral divididos em três amplas categorias, conforme apresentarem eritrócitos (i) microcíticos e hipocrômicos, (ii) normocíticos e normocrômicos, ou (iii) macrocíticos. Os distúrbios dos eritrócitos também podem ser classificados em congênicos e adquiridos. As anemias podem ainda ser classificadas, de acordo com o mecanismo causal, em anemias devidas predominantemente à insuficiente produção de eritrócitos e anemias decorrentes do encurtamento da sobrevivência dos eritrócitos; no segundo caso, se causado por defeito intrínseco aos eritrócitos ou por fatores extrínsecos. Também pode haver anemia pela retenção de eritrócitos no baço, quando aumentado, e em situação aguda, pela perda de sangue. Neste capítulo, os distúrbios da série vermelha serão discutidos em grupos relacionados principalmente às características morfológicas dos eritrócitos, incluindo o tamanho e o grau de hemoglobinação.

Anemias hipocrômicas e microcíticas e talassemias

Distúrbios decorrentes de defeito na síntese do heme

Anemia ferropênica

Desenvolve-se deficiência de ferro quando (i) a ingestão de ferro é insuficiente para as necessidades (p. ex., em surtos de crescimento ou na gravidez); (ii) há má absorção do ferro; (iii) há perda aumentada de ferro, geralmente em consequência de perdas sanguíneas uterinas ou no trato digestivo; (iv) há perda renal de hemossiderina como resultado de hemólise intravascular crônica; (v) há uma combinação desses fatores; ou, raramente, (vi) ocorre sequestração de ferro em um sítio inacessível, como na hemossiderose pulmonar idiopática. Em áreas geográficas onde há infestação por *Schistosoma haematobium*,

perda urinária de sangue também pode ser uma causa. Anemia ferropênica pode ser o aspecto inicial de gastrite autoimune, surgindo anos antes da anemia megaloblástica devida à ulterior deficiência de vitamina B₁₂. Desenvolve-se anemia quando se esgotam os estoques reticuloendoteliais de ferro na medula óssea e há insuficiente oferta de ferro aos eritroblastos em proliferação, levando à diminuição da síntese de heme e, em consequência, à produção reduzida de hemoglobina e de eritrócitos.

Os aspectos clínicos são os decorrentes da anemia, como fadigabilidade, palidez e dispneia de esforço. Aspectos mais específicos de deficiência de ferro, só aparentes quando esta é severa e duradoura, incluem coiloníquia (unhas em formato de colher), queilose angular (rachaduras na pele nos cantos da boca) e glossite (inflamação da língua).

Anemia ferropênica hereditária refratária ao ferro resulta de mutação bialélica, ocasionalmente monoalélica, no gene *TMPRSS6* [2]. Os aspectos hematológicos são idênticos aos das demais anemias ferropênicas.

É necessário considerar, também, a deficiência funcional de ferro, definida como uma situação em que falta ferro disponível à eritropoese apesar de haver ferritina sérica normal e presença de depósitos de ferro na medula óssea [3]. Este é um aspecto da anemia das doenças crônicas (ver adiante), mas é particularmente reconhecido nos pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento com agentes estimulantes da eritropoese.

Hemograma

Na deficiência de ferro, uma anemia normocítica e normocrômica, com anisocitose, precede o desenvolvimento de anisocromia, hipocromia e microcitose. Alterações morfológicas não costumam ser evidentes até a queda da hemoglobina (Hb) abaixo de 10-11 g/dL, quando começam a aparecer os aspectos característicos (Figura 8.1). A peilocitose inclui eliptócitos, em particular eliptócitos muito estreitos, frequentemente chamados de células

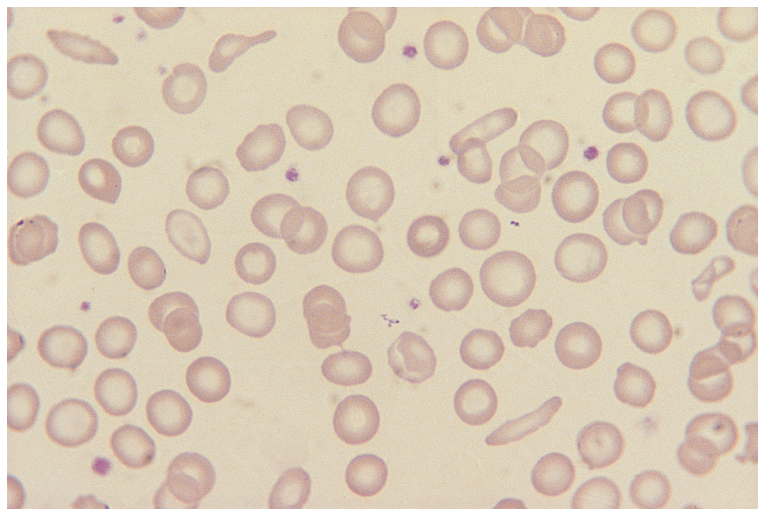


FIGURA 8.1 Distensão sanguínea de paciente com anemia ferropênica mostrando anisocitose, pecilocitose (incluindo eliptócitos), hipocromia e microcitose. O eritrograma (Coulter S Plus IV) mostrou: $E 4,22 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 7 g/dL, Hct 29%, VCM 67 fL, HCM 16,6 pg, CHCM 24,5 g/dL.

em lápis. Às vezes são notados pecilócitos designados pré-queratócitos; são eritrócitos que preservam a palidez central normal e mostram um vacúolo de contorno bem-definido junto à membrana; são mais frequentes na anemia ferropênica do que no traço β -talassêmico e na anemia de doença crônica [4]. Ocasionais eritrócitos em alvo (*target cells*) podem estar presentes [4], mas não costumam ser numerosos como no traço β -talassêmico. Número elevado de células em alvo, antes raras, pode surgir em pacientes com traço de hemoglobina S ou de hemoglobina C quando se tornam ferropênicos. Dacriócitos (pecilócitos em lágrima) podem estar presentes, particularmente com a acentuação da anemia. Pontilhado basófilo é raro. Policromatocitose algumas vezes está presente.

No hemograma feito na maioria dos modelos de contadores eletrônicos automatizados, a primeira evidência de deficiência de ferro é o aumento da amplitude de distribuição (volumétrica) dos eritrócitos (RDW), medida indicativa da anisocitose que precede a anemia. A alteração observada em seguida é a diminuição da Hb, da contagem de eritrócitos e do hematócrito (Hct), seguida pela diminuição do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM). Em um estudo feito com instrumentos de impedância (Sysmex K4500 ou Coulter S890), uma HCM abaixo de 26 pg mostrou-se um indicador mais sensível da falta de ferro do que um VCM abaixo de 80 fL; a sensibilidade a uma baixa ferritina sérica foi de 97% e 85%, respectivamente [5]. Na anemia ferropênica incipiente, a contagem de eritrócitos algumas vezes aumenta em vez de diminuir, sobretudo em crianças pequenas. Uma concentração hemoglobínica corpuscular

média (CHCM) diminuída, quando calculada a partir do micro-hematócrito e da Hb, ou quando medida pelos atuais instrumentos Siemens, é um indicador sensível de deficiência de ferro. Quando medida por instrumentos com base em impedância (como Coulter e Sysmex), a CHCM é menos sensível, porém, mais específica, para a deficiência de ferro. Com contadores da série Siemens H.1 e subsequentes, o aparecimento de uma população de células hipocrômicas e o aumento da amplitude de distribuição da hemoglobina (HDW) são as primeiras alterações detectadas; a queda da HCM e da CHCM precede a queda do VCM [6]. O instrumento recente, Sysmex XE-5000, também mede a concentração de hemoglobina individualmente nos eritrócitos e fornece uma percentagem de eritrócitos hipocrômicos (%*Hypo He*), análoga a do Siemens, e que aumenta precocemente na deficiência de ferro. Outros parâmetros eritrocíticos que diminuem na falta de ferro incluem o *RBC-Y* nos instrumentos Sysmex e a *Low Haemoglobin Density* (LHD) no Coulter 750 (uma transformação matemática da CHCM).

Na anemia ferropênica, a porcentagem de reticulócitos pode estar normal ou elevada, mas a contagem absoluta de reticulócitos é normal ou reduzida. Uma baixa do conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos (CHr) nos instrumentos Siemens precede as diminuições de Hb, HCM e VCM [7]. Diminuição da determinação análoga dos instrumentos Sysmex (Ret-He), também se mostra um sinal precoce de deficiência de ferro.

Pacientes ferropênicos não raramente apresentam trombocitose, o que pode resultar da própria deficiência de ferro, de perda sanguínea ou de uma doença maligna subjacente. Na deficiência grave de

ferro, a contagem de plaquetas às vezes está diminuída. Em até 10% dos pacientes, podem ocorrer leucopenia e trombocitopenia. Em alguns casos, podem ser vistos neutrófilos hipersegmentados, que não são necessariamente indicativos de deficiência coexistente de folato ou vitamina B₁₂. Em regiões geográficas onde há ancilostomose, eosinofilia é sinal sugestivo desta causa para a deficiência de ferro. Aspectos de hipoesplenismo no hemograma sugerem doença celíaca como causa subjacente.

Outros determinações automatizadas que se mostram úteis na identificação de deficiência funcional de ferro incluem: nos instrumentos Siemens, eritrócitos hipocrômicos (%HCR)³ 6% ou conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos (CHR) < 29 pg; e nos instrumentos Sysmex, um valor Ret-He < 30,6 pg [3]. A %Hypo-He do Sysmex e a LHD% do Beckman-Coulter são comparáveis à %HRC do Siemens (ver Capítulo 2).

Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial de anemia ferropênica, devem ser sempre considerados o traço talassêmico e a anemia de doença crônica (ADC). O hemograma auxilia na distinção, mas o diagnóstico definitivo exige exames específicos. A presença proeminente de eritrócitos em alvo e de pontilhado basófilo favorece a hipótese de talassemia menor, ao passo que a presença de anisocromia, de células em lápis e de pré-queratócitos favorece a hipótese de anemia ferropênica; o aumento da formação de *rouleaux* e da coloração de fundo, assim como a presença de outros sinais de inflamação, sugerem ADC. Alta contagem de eritrócitos com VCM baixo, apesar de Hb normal ou quase normal, são achados característicos do traço talassêmico, mas um eritograma idêntico pode ser encontrado em pacientes com policitemia vera, quando se tornam ferropênicos. O RDW geralmente aumenta na deficiência de ferro e é geralmente normal no traço talassêmico [8]. Uma CHCM baixa quando medida em contadores de impedância, menos sensíveis à hipocromia, é fortemente sugestiva de deficiência de ferro, uma vez que, no traço talassêmico e na ADC, a CHCM é geralmente normal (embora seja baixa na hemoglobinopatia H). Na deficiência de cobre, uma causa rara de anemia microcítica, o ferro sérico é baixo e a transferrina e a ferritina sérica são normais [9]. A raríssima aceruloplasminemia associa-se com anemia normocrômica normocítica ou hipocrômica microcítica, com ferro sérico baixo, transferrina normal e ferritina sérica um pouco aumentada. Outras condições raras que causam anemia microcítica estão listadas na Tabela 3.1, no Capítulo 3 “Morfologia das células sanguíneas”.

Exames adicionais

Na anemia ferropênica não complicada, o diagnóstico pode ser confirmado pelos seguintes achados: (i) ferritina sérica baixa ou (ii) ferro sérico baixo, coexistindo com transferrina ou capacidade ferropéxica sérica aumentada. É importante observar que a dosagem isolada do ferro sérico é uma informação de pouca utilidade, já que está diminuída tanto na deficiência de ferro quanto na ADC. Quando coexistem deficiência de ferro e inflamação crônica, pode não haver elevação da transferrina e da capacidade ferropéxica, e a ferritina sérica pode estar no limite inferior da normalidade, em vez de reduzida. Na anemia ferropênica não complicada, uma ferritina < 20 µg/L é comprobatória do diagnóstico, mas, no caso de doença hepática concomitante [10], foi sugerido um *cut-off* de 50 µg/L e, no caso de doença inflamatória crônica, de 70 µg/L [11]. Note-se que a ferritina pode ser enganosamente normal em pacientes com anemia ferropênica decorrente da rara hemossiderose pulmonar idiopática; a falta de ferro pode, entretanto, ser confirmada por baixo ferro sérico, aumento da capacidade ferropéxica e ausência de ferro na medula óssea [12]. A ainda mais rara síndrome hereditária hiperferritinemia-catarata não costuma estar associada a alterações hematológicas; entretanto, pode ocorrer falta de ferro concomitante, e nessa situação há anemia microcítica e hipocrômica com ferritina elevada, mas baixa saturação da transferrina [13]. Na anemia ferropênica refratária ao ferro, devida a uma mutação *TMPRSS6*, o ferro sérico e a saturação da transferrina estão baixos mas a ferritina sérica é normal [2].

Concentrações altas de protoporfirina eritrocitária livre e de zincoprotoporfirina são encontradas na anemia ferropênica, na ADC e na intoxicação por chumbo, mas é rara no traço talassêmico. A dosagem de qualquer uma delas é útil para confirmar o diagnóstico de anemia ferropênica em situações clínicas em que a carência de ferro não complicada seja comum, como na infância e na gestação; como podem ser feitas em amostras muito pequenas de sangue, são úteis em levantamentos populacionais.

Receptores solúveis de transferrina no soro aumentam na falta de ferro, mas não na anemia das doenças crônicas; o valor desse teste, entretanto, é prejudicado, pois os receptores solúveis também aumentam quando há expansão da eritropoese, como em anemias megaloblásticas, anemias hemolíticas, traço talassêmico e síndromes mielodisplásicas (SMDs). O quociente *receptores da transferrina/logaritmo da ferritina sérica* é um discriminante eficaz entre a falta de ferro e outras condições: aumenta na

TABELA 8.1 Comparação de resultados laboratoriais em anemia ferropênica, anemia de doença crônica e traço talassêmico

	Anemia ferropênica	Anemia de doença crônica	Anemia de doença crônica com deficiência de ferro	Traço talassêmico
Ferro sérico	Diminuído	Diminuído	Diminuído	Normal
Transferrina sérica ou capacidade ferropéxica	Aumentada	Normal ou diminuída	Variável	Normal
Saturação da transferrina	Diminuída, às vezes acentuadamente	Diminuída	Diminuída	Normal
Ferritina sérica	Diminuída (< 20 µg/L)	Normal ou aumentada	Normal ou diminuída (geralmente < 70 µg/L)	Normal
Protoporfirina zínica dos eritrócitos	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Normal ou pouco aumentada
Receptor solúvel da transferrina	Aumentado	Normal ou diminuído	Normal ou aumentado	Aumentado
Receptor solúvel da transferrina/log da ferritina sérica	Aumentado	Normal	Provavelmente aumentado	Normal
Log[receptor solúvel da transferrina/ferritina sérica]	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal
Ferro na medula óssea	Ausente	Presente, frequentemente aumentado	Ausente	Presente

deficiência de ferro, mas não na ADC [14], no traço β-talassêmico [15] nem na expansão da eritropoese por SMD [15]. Esse quociente é particularmente útil em idosos, pois neles os testes usuais para deficiência de ferro são insensitivos pela presença frequente de inflamação crônica [16]. Outro quociente, *log[receptores solúveis/ferritina sérica]*, mostra relação linear com as reservas de ferro do organismo [17] e também fornece uma distinção melhor entre deficiência de ferro (com ou sem inflamação crônica) e outras condições. Se a dosagem de receptores solúveis da transferrina não estiver disponível, pode-se identificar com exatidão a maioria dos pacientes ferropênicos por meio de um gráfico em que a ferritina é plotada contra a velocidade de sedimentação globular (VSG) [18]. A Organização Mundial da Saúde (OMS), recomendou a ferritina sérica como o teste-padrão para deficiência de ferro, mas a ser complementado pelos receptores solúveis de transferrina em países onde infecções tenham prevalência elevada. Em casos complicados, o teste definitivo é a demonstração da ausência de ferro na medula óssea.

Anormalidades bioquímicas da anemia ferropênica estão resumidas na Tabela 8.1.

A sobrevida eritrocitária média na anemia ferropênica está moderadamente diminuída para 46-85 dias [19].

Deficiência de ferro não deve ser considerada um diagnóstico satisfatório até que seja identificada a causa subjacente, seja pela história, por exame físico ou por exames complementares. No Reino Unido, há uma significativa incidência (cerca de 10%) de doença celíaca insuspeitada em adultos que apresentam anemia ferropênica. Justifica-se, por isso, fazer testes de triagem para doença celíaca

sempre que não houver causa óbvia para uma deficiência de ferro [20]. Deficiência de ferro coexistente com doença tireóidea autoimune ou diabetes melito sugere haver gastrite autoimune subjacente, possivelmente desenvolvida por infecção com *Helicobacter pylori* [1]. A possibilidade de um tumor oculto no trato digestivo e, em áreas endêmicas, de parasitose também deve ser considerada e investigada apropriadamente. Parasitos causais incluem ancilóstomos e *Blastocystis hominis*. Em pacientes com anemia ferropênica refratária ao tratamento com ferro oral, os diagnósticos* a considerar são doença celíaca, gastrite autoimune e infecção por *H. pylori*, as duas últimas geralmente concomitantes. Os raros casos de anemia ferropênica hereditária refratária ao ferro podem ser confirmados pela sequenciação genética em laboratório de referência.

Anemia de doença crônica

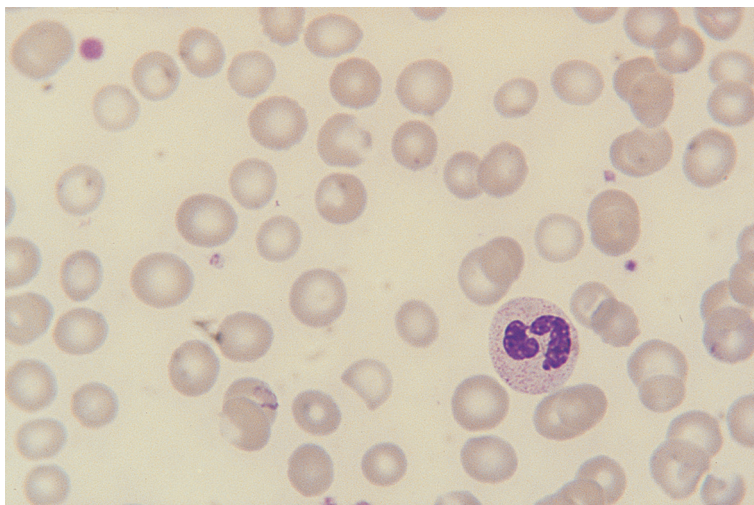
Anemia de doença crônica (ou anemia das doenças crônicas) (ADC) é o termo usado para descrever a anemia que resulta de infecção ou inflamação crônicas ou de doença maligna e que se caracteriza por (i) baixo ferro sérico e incorporação defeituosa do ferro à hemoglobina, apesar de haver estoques adequados na medula óssea, (ii) resposta inadequada da produção de eritropoetina à anemia e (iii) moderado encurtamento da sobrevida eritroide [12]. As manifestações clínicas devem-se à doença causal, aos efeitos da anemia ou a ambos.

Hemograma

A ADC, quando leve, é normocítica e normocrômica, mas, à medida que se agrava, surgem hipocromia

*N. de T. No Brasil, atualmente, a causa mais comum é cirurgia bariátrica, feita há 2 anos ou mais.

FIGURA 8.2 Distensão sanguínea de paciente com anemia de doença crônica decorrente de um linfoma, mostrando anisocitose, pecilocitose e hipocromia leves. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $3,10 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 7,4 g/dL, Hct 23%, VCM 75,6 fL, HCM 23,8 pg, CHCM 31,5 g/dL.



e microcitose (Figura 8.2). Na inflamação crônica grave, o grau de microcitose pode ser tão acentuado quanto na anemia ferropênica. Relatou-se que o RDW seria normal na ADC [3], mas esta não tem sido uma observação consistente [22]. A contagem absoluta de reticulócitos está diminuída. Podem estar presentes sinais indicativos de inflamação crônica, como neutrofilia, trombocitose, exagero na formação de *rouleaux* e presença de coloração de fundo na distensão sanguínea. Células em lâpis e pré-queratócitos são menos frequentes que na anemia ferropênica, e células em alvo menos frequentes tanto em relação à anemia ferropênica como ao traço β -talassêmico. Pontilhado basófilo só se nota em uma minoria de pacientes, muito menos do que no traço β -talassêmico [4].

Diagnóstico diferencial

É necessário diferenciá-la da anemia ferropênica, conforme já descrito, bem como de outras anemias normocrômicas normocíticas e hipocrômicas microcíticas.

Exames adicionais

Ferro sérico e capacidade ferropéxica (ou transferrina sérica) estão diminuídos. A ferritina sérica está aumentada, devido à síntese de apoferritina pelas células inflamatórias ou neoplásicas. Sinais concomitantes de inflamação crônica são úteis para o estabelecimento do diagnóstico. Além dos que estão presentes no hemograma, outros sinais comumente encontrados são VSG e proteína C-reativa aumentadas, baixa da albumina e aumento do fibrinogênio, da α_2 -macroglobulina e das γ -globulinas. A protoporfirina eritrocitária livre e a protoporfirina

zínica estão aumentadas, como na anemia ferropênica, de modo que as dosagens não se prestam à diferenciação. Os receptores de transferrina livres no soro costumam estar normais ou reduzidos.

Em pacientes com ADC causada por doença maligna ou inflamação crônica, não é raro estabelecer-se uma deficiência de ferro, em geral como decorrência de perdas sanguíneas no trato digestivo. Uma comparação de resultados comuns em ADC, em anemia ferropênica e em casos em que há concomitância dessas condições é mostrada na Tabela 8.1. Mesmo com o hemograma e esse conjunto de dados bioquímicos, nem sempre é possível diagnosticar situação tão complexa; torna-se necessária uma aspiração de medula óssea (mielograma) com coloração de Perls para chegar a um diagnóstico definitivo.

Anemia sideroblástica congênita

Trata-se de uma rara condição genética; na maioria das famílias, a herança é ligada ao sexo, por isso manifesta-se só no sexo masculino. Raramente ocorre em mulheres, como decorrência de inativação (Lyonização) tendenciada do cromossomo X; nesses casos, pode manifestar-se tardiamente, até na velhice [23]. A anemia sideroblástica ligada ao sexo, responsiva à piridoxina, resulta de um bloqueio na síntese do heme, devido a mutação no gene eritroide-específico ácido 5-amino levulínico sintetase, *ALAS2* [24]. Mutação em um estimulador de *ALAS* eritroide-específico, localizado no primeiro íntron do gene *ALAS*, também pode ser responsável, mas, nesse caso, a condição é refratária à piridoxina [25]. Além disso, anemia sideroblástica autossômica dominante refratária à piridoxina pode resultar de mutação no gene *SLC25A38* [26].

ou no gene *GLRX5* [27]. Herança autossômica dominante, com base genética ainda não identificada, também foi descrita em uma família. Em casos de anemia sideroblástica que não fazem parte de síndromes mais amplas, os aspectos clínicos são apenas os devidos à anemia, às vezes complicada com sobrecarga de ferro. Só os casos resultantes de mutação *ALAS2* respondem à piridoxina [28].

Foram descritas várias síndromes das quais a anemia sideroblástica faz parte. Anemia sideroblástica recessiva ligada ao sexo, devida a uma mutação em *ABCB7*, um gene que codifica uma proteína transportadora mitocondrial, associa-se com ataxia espinocerebelar [29]. Anemia sideroblástica autossômica recessiva com miopatia e acidose láctica pode dever-se tanto a mutação no gene *PUS1* como no gene *YARS2* [28]. Foi descrita uma síndrome de anemia sideroblástica congênita severa com imunodeficiência de células B, febre periódica e retardo de desenvolvimento (síndrome SIFD – *Sideroblastic anemia, Immune deficiency, Fever, Development delay*) [30]; a base molecular ainda não foi definida. Porfíria eritropoética, devida à co-herança de uma mutação com perda de função no gene *FECH* e um alelo de baixa expressão do mesmo gene, associa-se com anemia hipocrômica e microcítica em 20-60% dos pacientes [31]. Em uma única família, uma anemia sideroblástica congênita, com os acometidos dependentes de transfusão, mostrou-se decorrer de mutação no gene *STEAP3* junto com expressão alélica baixa do gene homólogo [32]. Na síndrome de Pearson, resultante de mutação em um gene mitocondrial, a anemia é normocítica ou macrocítica em vez de microcítica [33]. De modo similar, em duas outras raras síndromes hereditárias, há macrocitose associada a eritropoese, ao mesmo tempo sideroblástica e megaloblástica; essas síndromes

são a anemia megaloblástica tiamino-responsiva com diabetes melito e surdez sensorio-neural, devida a mutação no gene *SLC19A2*, e a síndrome DIDMOAD (**D**iabetes **I**nsípido, **D**iabetes **M**elito, atrofia óptica [*Optic Atrophy*] e surdez [*Deafness*], também designada síndrome de Wolfram, devida a mutação no gene *WFS1* [34].

Hemograma

A Hb varia de 3 a 4 g/dL a quase normal. A severidade da anemia difere de acordo com o defeito genético; pacientes com a mutação *SLC25A38*, por exemplo, são transfusão-dependentes. A distensão sanguínea mostra dimorfismo (Figura 8.3) ou hipocromia e microcitose uniformes. Às vezes, há células em alvo e pontilhado basófilo. A pecilocitose pode ser acentuada, e podem ser notados corpúsculos de Pappenheimer. Em pacientes mais velhos pode haver hiperesplenismo pela sobrecarga de ferro, com leucopenia e trombocitopenia leves. Na síndrome SIFD, não há dimorfismo: há hipocromia, microcitose, esquizócitos, pontilhado basófilo, vários eritroblastos e linfocitopenia [30].

VCM e HCM estão diminuídos; algumas vezes, também a CHCM. Histogramas e citogramas podem mostrar duas populações de eritrócitos.

Raras dentre as anemias sideroblásticas de herança materna e com baixa porcentagem de sideroblastos em anel na medula óssea, associam-se com macrocitose [35], o que também ocorre na síndrome de Pearson, na anemia megaloblástica responsiva à tiamina e na síndrome DIDMOAD. Na síndrome de Pearson, além da anemia normocítica ou macrocítica, um quarto dos pacientes tem neutropenia ou trombocitopenia [33].

Mulheres portadoras heterozigóticas do gene da anemia sideroblástica congênita resultante

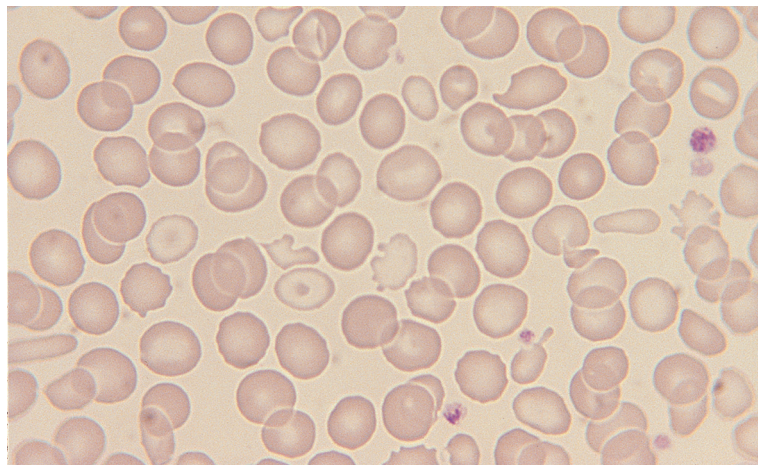
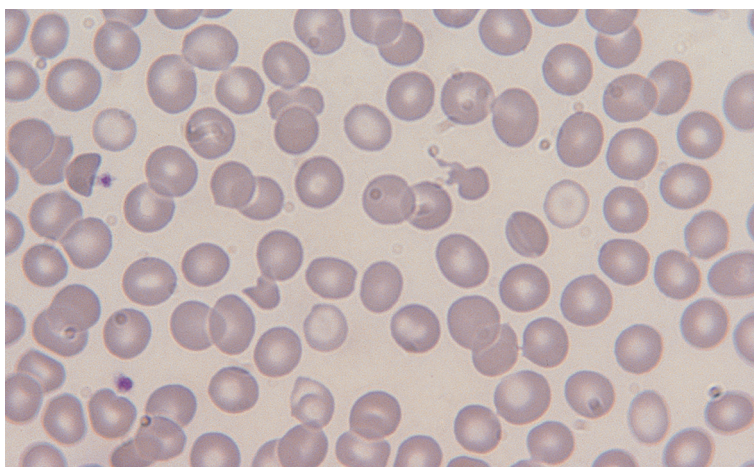


FIGURA 8.3 Aspecto dimórfico da distensão sanguínea de paciente com anemia sideroblástica congênita. Há pequena população de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos, algumas células em alvo e pecilocitose. O paciente respondeu anteriormente à piridoxina com aumento de Hb e estava em tratamento quando esta amostra foi coletada.

FIGURA 8.4 Distensão sanguínea de portadora não anêmica de anemia sideroblástica, filha de paciente com anemia microcítica moderada. Nota-se aspecto dimórfico, com pequena população de micrócitos hipocrômicos.



de mutação *ALAS2*, que não são anêmicas, podem apresentar pequena população de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos (Figura 8.4). Raramente têm anemia similar à observada no sexo masculino, por Lyonização desigual. O dimorfismo, notado à microscopia e correspondentes histogramas e citogramas, pode ser mais evidente em mulheres heterozigóticas do que em homens hemizigóticos [36]. Portadoras da mutação *ABCB7* podem ter, também, uma população de macrócitos hipocrômicos [29].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da anemia sideroblástica ligada ao sexo inclui a anemia ferropênica e os traços talassêmicos. Ferro sérico e ferritina são normais ou elevados; cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e eletroforese da hemoglobina são normais, bem como a porcentagem de hemoglobina A₂. Não costuma ser difícil estabelecer distinção entre a anemia sideroblástica congênita e as adquiridas, pois as últimas caracterizam-se por apresentar eritrócitos predominantemente normocíticos ou macrocíticos, tendo apenas uma pequena população de micrócitos hipocrômicos.

O diagnóstico diferencial da síndrome de Pearson inclui as síndromes de insuficiência congênita da medula óssea. O diagnóstico diferencial da anemia megaloblástica tiamino-responsiva e da síndrome DIDMOAD inclui as demais causas de anemia megaloblástica.

Exames adicionais

O diagnóstico é feito pelo mielograma; a coloração de Perls mostra sideroblastos em anel. Na síndrome de Pearson, serão notadas, além dos sideroblastos em

anel, hipoplasia eritroide e vacuolização dos precursores eritroides e granulocíticos. Dosagens bioquímicas das enzimas envolvidas na síntese de heme ajudam a diferenciar os tipos; análises de DNA dos genes relevantes são utilizadas como confirmação. A ferritina sérica deve ser monitorizada para permitir detecção precoce da sobrecarga de ferro.

Intoxicação por chumbo

Chumbo em excesso interfere na síntese de heme e também provoca hemólise. Pacientes com efeitos hematológicos significativos geralmente também têm os demais sintomas e sinais de intoxicação por chumbo, como dor abdominal, constipação e linha plúmbea nas gengivas; por isso, da história clínica e o exame físico são úteis para o diagnóstico. A origem pode ser o uso de louça contendo chumbo, cosméticos e medicamentos alternativos ou “herbais” e outros.

Hemograma

Em geral, a anemia é de leve a moderada. A distensão sanguínea pode mostrar eritrócitos hipocrômicos e microcíticos, ou normocíticos e normocrômicos, com certa policromatocitose. Pontilhado basófilo costuma ser chamativo (Figura 8.5). Podem estar presentes corpúsculos de Pappenheimer, pois o chumbo causa eritropoese sideroblástica. A porcentagem e a contagem absoluta de reticulócitos costumam estar elevadas. Os índices hematimétricos são normais ou há baixa de VCM, HCM e CHCM.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui as demais causas de anemia microcítica hipocrômica e também as anemias hemolíticas, em particular a anemia devida à

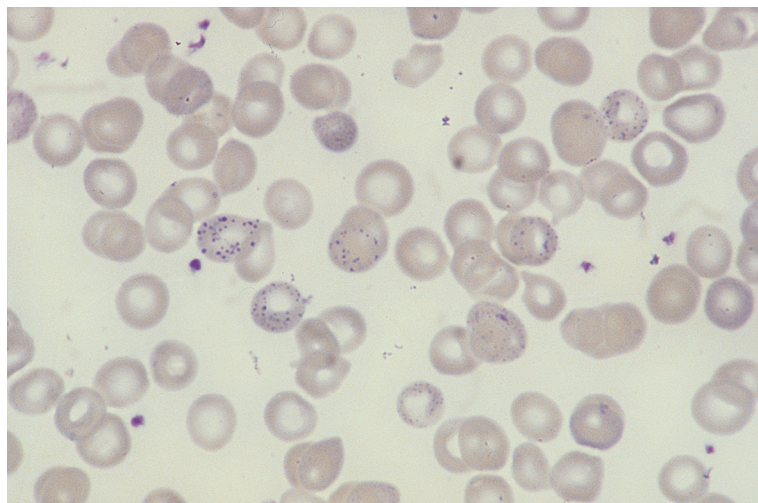


FIGURA 8.5 Distensão sanguínea de paciente com intoxicação por chumbo mostrando anisocitose, hipocromia e pontilhado basófilo proeminente. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $2,99 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 8,3 g/dL, Hct 25%, VCM 85 fL, HCM 27,8 pg, CHCM 32,7 g/dL, reticulócitos $281 \times 10^3/\mu\text{L}$.

deficiência de pirimidina 5'-nucleotidase, na qual há, também, pontilhado basófilo chamativo. Deve-se observar que intoxicação por chumbo e deficiência de ferro frequentemente coexistem.

Exames adicionais

Uma taxa sérica elevada de chumbo confirma o diagnóstico. A protoporfirina eritrocitária livre e a protoporfirina zínica estão aumentadas, pois a ferroquelatase é inibida pelo chumbo, mas esse resultado não a diferencia da anemia ferropênica. Quando há um componente hemolítico, há aumento dos receptores de transferrina livres no soro, o que torna o teste igualmente inútil para diferenciá-la da anemia ferropênica.

Distúrbios resultantes de defeito na síntese de cadeias globínicas β

Traço β -talassêmico

Traço β -talassêmico (ou β -talassemia menor) refere-se à heterozigose para a β -talassemia, condição hereditária na qual uma mutação em um gene da β -globina – mais raramente, deleção de um gene da β -globina – leva à redução no ritmo de síntese das cadeias de β -globina, com consequente redução do ritmo de síntese da hemoglobina. A hiperplasia eritroide compensatória leva à produção de um número aumentado de eritrócitos, mas com tamanho e conteúdo hemoglobínico reduzidos. As mutações que causam β -talassemia são muito numerosas e heterogêneas. Em alguns casos, o gene anormal causa ausência de produção de cadeias β (β^0 -talassemia); em outros, o gene anormal permite a síntese de cadeias β , mas em velocidade reduzida (β^+ -talassemia). A prevalência das inúmeras

mutações, produzindo defeitos de gravidade variada, tem distribuição geográfica heterogênea.

O traço β -talassêmico ocorre em praticamente todos os grupos étnicos, mas é raro em indivíduos brancos de origem norte-europeia. É muito comum na Grécia e na Itália, onde a prevalência em algumas regiões chega a 15-20%. Há prevalência semelhante em Chipre, tanto entre cipriotas gregos como turcos. Em algumas regiões da Índia e da Tailândia, assim como em outras áreas do Sudeste Asiático, a prevalência chega a 5-10%. Nos afro-americanos é de cerca de 0,5%, e nos afro-caribenhos, de aproximadamente 1%.

O estado heterozigótico para a β -talassemia costuma ser clinicamente inaparente, por isso utiliza-se a designação alternativa β -talassemia menor. Alguns pacientes têm discreta esplenomegalia ou sintomas e sinais decorrentes da anemia.

Uma deficiência adquirida de atividade de pirimidina 5'-nucleotidase é comum no traço β -talassêmico, possivelmente em decorrência de dano oxidante à enzima [37].

Hemograma

A maioria dos indivíduos com β -talassemia menor tem Hb dentro dos limites de referência, mas significativamente abaixo da média; um pequeno percentual é levemente anêmico, em particular durante gravidez ou infecções intercorrentes. Anemia é mais comum em gregos e italianos do que em populações de origem africana. Apesar de não haver anemia, a microcitose é acentuada. A distensão sanguínea (Figuras 8.6 e 8.7) pode mostrar ou não hipocromia, além de microcitose. A concentração hemoglobínica dos eritrócitos parece

FIGURA 8.6 Distensão sanguínea de indivíduo sadio com β -talassemia menor, mostrando mínimas alterações morfológicas – microcitose e pecilicitose. Sem os índices hematimétricos, o diagnóstico teria passado despercebido. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $7,3 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 14,3 g/dL, Hct 43%, VCM 59 fL, HCM 19,7 pg, CHCM 32,8 g/dL.

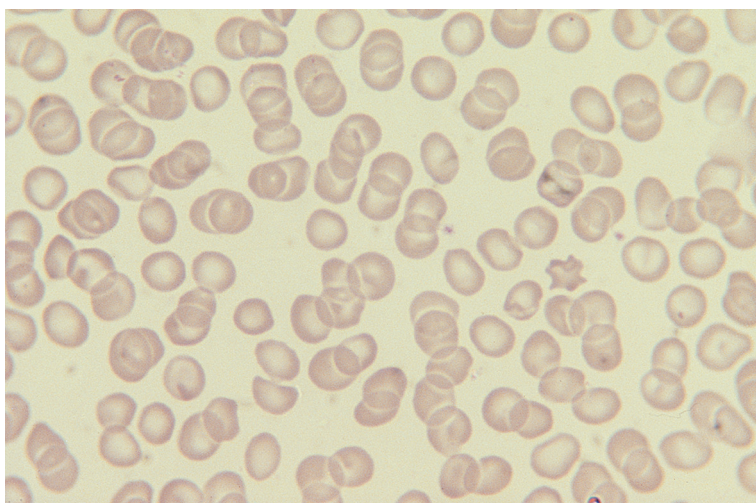
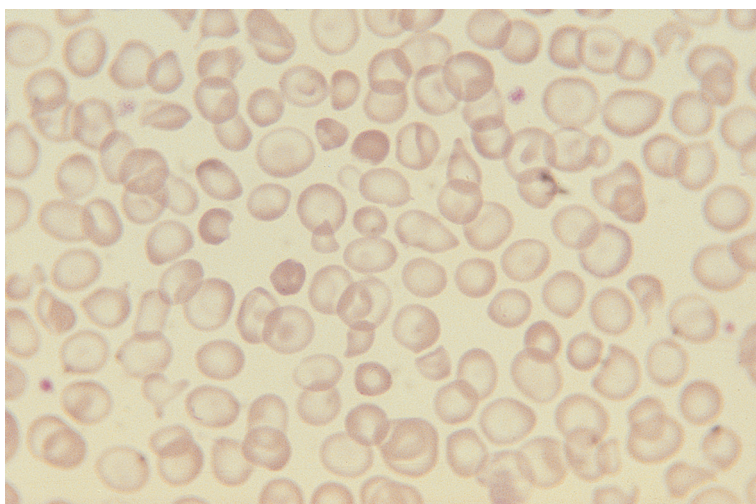


FIGURA 8.7 Distensão sanguínea de indivíduo sadio com β -talassemia menor, mostrando anormalidades morfológicas mais acentuadas – anisocitose, pecilicitose, hipocromia, microcitose, eritrócitos em alvo e várias células irregularmente contraídas. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $5,78 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 10,5 g/dL, Hct 32%, VCM 56 fL, HCM 18,2 pg, CHCM 32,3 g/dL.



uniforme, em contraste com a anisocromia, que comumente se nota na deficiência de ferro. A pecilicitose varia de não significativa a acentuada. Eritrócitos em alvo podem ser numerosos, mas, em alguns pacientes, são raros ou ausentes. Eritrócitos irregularmente contraídos são vistos em alguns pacientes. Pacientes ocasionais apresentam eliptocitose acentuada, mas, de modo geral, eliptócitos não são uma característica. Pontilhado basófilo é usual em indivíduos de origem mediterrânea, mas menos frequente em indivíduos de origem africana e asiática; a deficiência adquirida de pirimidina 5'-nucleotidase talvez seja o fator causal do pontilhado basófilo. A porcentagem e a contagem absoluta de reticulócitos costumam estar um pouco aumentadas [38]. Em casos sem complicações, leucócitos e plaquetas são normais.

Os índices hematimétricos do traço β -talassêmico são característicos, sendo mais fácil fazer um diagnóstico presuntivo correto a partir deles do que da microscopia de distensões sanguíneas. Hb e Hct são normais ou quase normais, ao passo que VCM e HCM estão acentuadamente diminuídos. A CHCM é normal quando medida por contadores de impedância, como os instrumentos Sysmex ou Coulter, mas, com frequência, um pouco diminuída quando medida pelos instrumentos das séries Siemens H.1 e Advia. Quando o número de eritrócitos hipocrômicos e o de eritrócitos microcíticos são medidos independentemente, a porcentagem de micrócitos em geral excede a de eritrócitos hipocrômicos no traço β -talassêmico, ao passo que o inverso é constatado na deficiência de

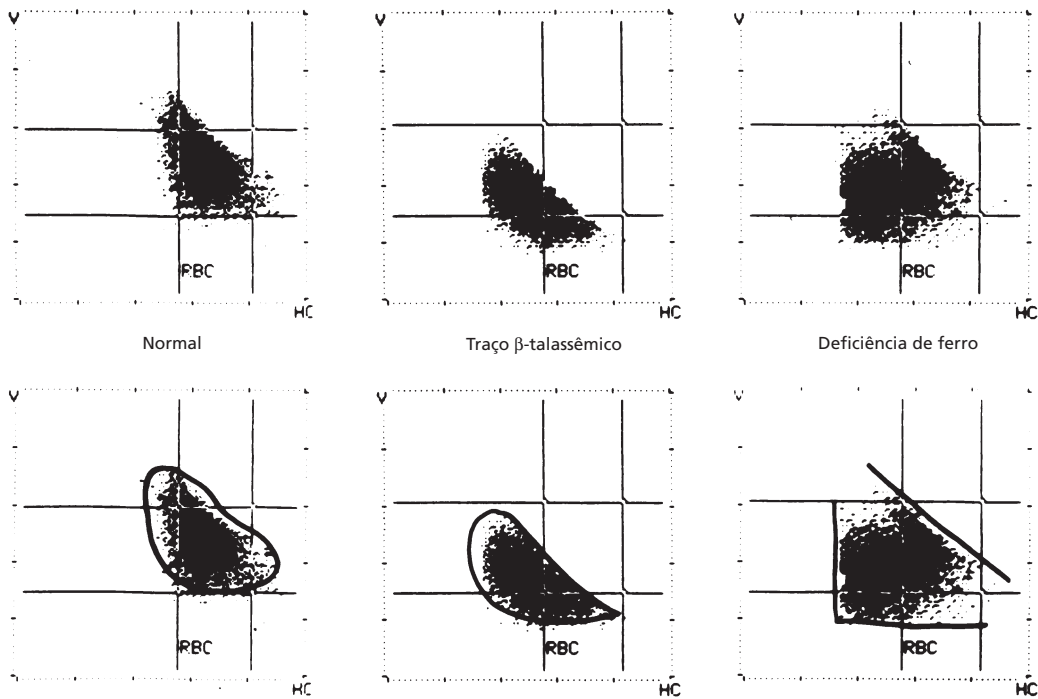


FIGURA 8.8 Citogramas fornecidos pelo contador Bayer H.2 mostrando o relacionamento entre a hemoglobinizacão (eixo x) e o volume (eixo y) em cada eritrócito em indivíduo normal (à esquerda) e em pacientes com β -talassemia menor (centro) e deficiência de ferro (à direita). O formato de “vírgula” na talassemia menor é aparente e foi enfatizado pelos traçados dos contornos dos citogramas repetidos na série inferior de *scatter plots*.

ferro [39]; o citograma eritroide mostra, caracteristicamente, formato de vírgula (Figura 8.8). Em contrapartida à deficiência de ferro, o RDW é geralmente normal [8]; porém, quando um paciente com traço β -talassêmico anemiza, o RDW tende a aumentar [3], de modo que a medida do RDW é menos útil, justamente quando é mais necessária. Outros observadores têm verificado certa elevação do RDW mesmo em casos não anêmicos [22].

O diagnóstico do traço talassêmico é mais difícil em gestantes por duas razões. (i) Os índices eritrócíticos são menos característicos, pois a hemodiluição, um efeito fisiológico da gravidez, diminui proporcionalmente E, Hb e Hct; na gestante com traço β -talassêmico, a Hb pode chegar a 5 a 6 g/dL [40]. O aumento do VCM que ocorre na gravidez também contribui para que os índices hematimétricos sejam menos característicos do que fora de gravidez. (ii) Há aumento de incidência de anemia ferropênica durante a gravidez e, quando as duas condições coexistem, o diagnóstico torna-se mais complicado.

Diagnóstico diferencial

Os diagnósticos diferenciais importantes do traço β -talassêmico devem ser feitos com o traço α -talassêmico e a anemia ferropênica. Várias fórmulas aritméticas foram criadas para distingui-la da deficiência de ferro [41-48]; embora possam ser úteis para distinguir casos não complicados, as fórmulas em geral não são aplicáveis a gestantes [49] ou a crianças, e tampouco são úteis em pacientes que apresentam ambas as condições – deficiência de ferro e traço β -talassêmico – situação que não é rara em pacientes oriundos do subcontinente indiano. Embora essas fórmulas indiquem o diagnóstico mais provável, não evitam a necessidade de exames específicos em circunstâncias em que o diagnóstico de traço talassêmico seja importante, como no aconselhamento genético pré-natal, pré-conceptual ou pré-marital. Nessas situações, VCM ou HCM podem ser usados como triagem, fazendo-se (HPLC) ou teste equivalente nos pacientes cujos resultados caírem abaixo de um limite arbitrário. Pacientes ocasionais, com variantes genéticas leves do traço

β -talassêmico, apresentam apenas uma diminuição discreta do VCM e da HCM, e, se esses casos precisarem de identificação, será necessário testar todos os pacientes com resultados abaixo do limite de referência inferior. Nem mesmo esse procedimento detectará todos os casos, uma vez que em algumas variantes talassêmicas leves não há defeito hematológico aparente nos heterozigotos; tais casos não podem ser diagnosticados apenas com o hemograma. Porém, salvo quando o aconselhamento genético está sendo realizado em áreas de alta incidência, é necessário arbitrar um *cut-off* para investigação mais avançada, no limite de referência inferior ou um pouco abaixo dele, a fim de evitar uma porcentagem muito alta de testes negativos, com um rendimento muito baixo de diagnósticos positivos.

Não é possível, apenas com o hemograma, distinguir o traço β -talassêmico dos traços $\delta\beta$ ou $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassêmicos, ou de casos de traço α -talassêmico com deleção de dois dos quatro genes α . Os casos de traço α -talassêmico com apenas uma deleção apresentam anormalidades hematológicas insignificantes, por isso há menor probabilidade de confundirlos com traço β -talassêmico. Pacientes ocasionais, com eritrograma sugestivo de traço talassêmico, têm uma cadeia β altamente instável ou uma hemoglobina anormal, sintetizada em velocidade reduzida. A mais comum deste último grupo é a hemoglobina E: índices hematimétricos sugestivos de traço β -talassêmico podem decorrer de heterozigose para essa variante hemoglobínica e esses índices são característicos da homozigose. A hemoglobina Lepore resultante da formação de um gene de fusão $\delta\beta$, muito mais rara, é sintetizada a uma velocidade muito reduzida e o eritrograma assemelha-se ao do traço β -talassêmico. Não é rara, também, uma microcitose leve no traço de células falciformes e no traço da hemoglobinopatia C, embora isso provavelmente seja devido à associação com traço α -talassêmico.

Os índices hematimétricos de paciente policitemico deficiente em ferro podem ser indistinguíveis dos índices do traço talassêmico, mas o RDW tem maior probabilidade de estar elevado, podendo haver outros sinais úteis para o diagnóstico diferencial, como neutrofilia, basofilia, trombocitose e presença de plaquetas gigantes. Índices característicos de talassemia também podem ser simulados pela anemia ferropênica em tratamento. A acentuada elevação do RDW (e do HDW) ou a detecção de duas populações eritroides na distensão sanguínea ou no histograma do contador automatizado sugere o diagnóstico correto.

A ADC costuma ser facilmente diferenciada da β -talassemia menor, devido ao maior grau de anemia e à manutenção de um VCM normal até o desenvolvimento de anemia significativa.

Exames adicionais

O diagnóstico definitivo da β -talassemia menor é geralmente feito por HPLC, por permitir simultaneamente a dosagem de hemoglobina A_2 e a detecção de hemoglobinas variantes. Técnicas alternativas incluem eletroforese capilar e eletroforese em acetato de celulose, esta complementada por dosagem da hemoglobina A_2 por cromatografia em microcoluna. A hemoglobina F está elevada em um terço dos pacientes, mas é menos específica do que o aumento da porcentagem de hemoglobina A_2 e não é necessária ao diagnóstico. Os traços $\delta\beta$ ou $\epsilon\gamma\delta\beta^0$ -talassêmicos são diagnosticados quando há índices hematimétricos talassêmicos com hemoglobina A_2 normal ou baixa e hemoglobina F elevada. O diagnóstico dos raros casos do traço $\epsilon\gamma\delta\beta$ (também denominada $\gamma\delta\beta$ -talassemia) requer análise de DNA. O traço da hemoglobina Lepore é diagnosticado quando há índices talassêmicos com hemoglobina A_2 normal ou reduzida e pequena quantidade de uma hemoglobina anormal com a mesma mobilidade da hemoglobina S em pH alcalino e da A em pH ácido, e com tempo de retenção em HPLC similar ao da hemoglobina A_2 . As hemoglobinas E, C e S também serão detectadas à eletroforese ou à HPLC.

Como a deficiência de ferro causa redução da porcentagem de hemoglobina A_2 , alguns casos leves de β -talassemia menor podem passar despercebidos se os exames forem feitos quando o paciente tiver deficiência de ferro coexistente. Exceto no caso de gestantes, quando o diagnóstico deve ser imediato, é aconselhável **não** realizar a eletroforese em pacientes que pareçam ter deficiência de ferro não complicada; em vez disso, deve-se verificar se o hemograma normaliza após tratamento com ferro.

A maioria dos exames usados para confirmar diagnóstico de deficiência de ferro são normais no traço β -talassêmico (ver Tabela 8.1). A porfirina zínica, entretanto, está um pouco aumentada, e os receptores solúveis de transferrina estão aumentados aos níveis vistos na deficiência de ferro [15].

β -Talassemia maior

A β -talassemia maior é uma doença hereditária, resultante de homozigose ou de heterozigose composta para genes da β -talassemia, levando à redução drástica ou à ausência de síntese de cadeias de β -globina, com diminuição considerável, ou incapacidade total,

de síntese de hemoglobina A. Há hiperplasia eritroide acentuada e eritropoese ineficaz, devida ao dano aos eritroblastos em desenvolvimento pelo excesso de cadeias α livres. Clinicamente, há anemia grave, hepatomegalia, esplenomegalia e expansão dos ossos que contêm medula hematopoética, provocando proeminência frontal e deformidades maxilares; há significativo retardo de crescimento. O tratamento com reposição transfusional periódica melhora os aspectos clinicopatológicos, mas, se não houver tratamento quelante simultâneo, provoca sobrecarga de ferro, dano tecidual e morte prematura.

Hemograma

A anemia é grave com hemoglobina muito baixa, às vezes, até de 2 a 3 g/dL. A distensão sanguínea (Figura 8.9) mostra anisocitose e pecilocitose extremas; os pecilócitos incluem eritrócitos em alvo, eritrócitos em lágrima (dacriócitos), eliptócitos, fragmentos e muitos eritrócitos de formato bizarro. À observação microscópica, a hipocromia é evidente, mas a microcitose nem sempre é tão óbvia, pois os eritrócitos são muito achatados, com diâmetro maior do que o esperado para o volume. Há pontilhado basófilo e corpúsculos de Pappenheimer. Às vezes, alguns eritrócitos contêm inclusões com as mesmas características de coloração da hemoglobina: são precipitados das cadeias α em excesso e são mais bem notadas em preparações para corpos de Heinz. Eritroblastos são frequentes: são micronormoblásticos e mostram aspectos diseritropoéticos, hemoglobinizados defeituosa e corpúsculos de Pappenheimer. Frequentemente, há neutrofilia e, em crianças pequenas, linfocitose. A contagem de plaquetas pode estar

normal ou aumentada. Na doença avançada, com pronunciada esplenomegalia, a contagem de plaquetas diminui.

Após a esplenectomia, geralmente feita para diminuir o desconforto da esplenomegalia ou as necessidades transfusionais, a contagem total de células nucleadas aumenta muito, por leucocitose e eritroblastemia; a contagem de plaquetas também aumenta. A distensão sanguínea torna-se ainda mais grosseiramente alterada e característica, com grande número de eritroblastos anormais, numerosos eritrócitos em alvo, corpúsculos de Pappenheimer e corpos de Howell-Jolly. Após a esplenectomia, preparações para corpos de Heinz mostram inclusões desiguais em 10 a 20% dos eritrócitos; elas representam precipitados de cadeias α e diferem de corpos de Heinz resultantes de estresse oxidante por não se encontrarem ligadas à membrana das células e por estarem presentes tanto em eritroblastos como em eritrócitos [50]. Após a esplenectomia, em resposta a infecções intercorrentes, há linfocitose ou neutrofilia exageradas.

Em pacientes adequadamente transfundidos, a distensão sanguínea é dimórfica, predominando percentualmente os eritrócitos transfundidos sobre os eritrócitos anormais do paciente.

O hemograma automatizado mostra uma severa anemia microcítica, com VCM, HCM e CHCM muito baixos, e aumento do RDW e do HDW. A contagem total de células nucleadas está muito aumentada, devido à presença numerosa de eritroblastos e da leucocitose verdadeira. A contagem total de células nucleadas não é confiável em todos os modelos de contadores automatizados; alguns não são fidedignos na contagem de eritrócitos nucleados.

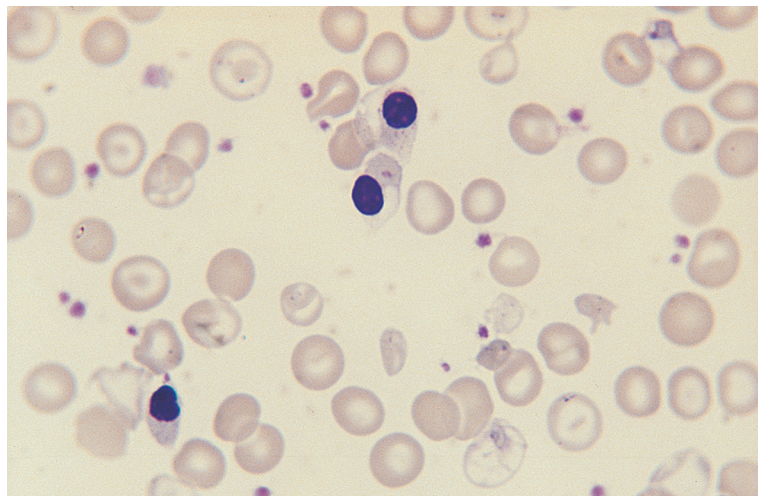


FIGURA 8.9 Distensão sanguínea de paciente com β -talassemia maior que foi esplenectomizado e vem recebendo transfusões periódicas. Nota-se dimorfismo, com dois terços dos eritrócitos constituídos por células do doador. Os eritrócitos do próprio paciente mostram acentuada anisocitose, pecilocitose e hipocromia. Há vários eritrócitos em alvo e três eritroblastos. Algumas células contêm corpúsculos de Pappenheimer e, em um eritrócito (muito hipocrômico) e um eritroblasto, há inclusões que representam cadeias α precipitadas.

Instrumentos recentes não têm esse problema pois os eritroblastos são contados separadamente dos leucócitos.

Diagnóstico diferencial

A talassemia intermédia, discutida a seguir, distingue-se da talassemia maior em bases clínicas, mais do que hematológicas. É uma condição geneticamente heterogênea, mas, em grande parte dos casos, deve-se à homozigose ou à heterozigose composta para os genes da β^+ -talassemia leve. Na talassemia intermédia, a Hb costuma estar acima de 7-8 g/dL, e os demais achados do sangue periférico são intermediários entre os de talassemia maior e os de talassemia menor. O estado heterozigótico composto para β -talassemia e hemoglobina E também pode apresentar aspectos hematológicos que lembram os encontrados na β -talassemia maior.

Exames adicionais

O diagnóstico requer HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram apenas hemoglobinas F e A_2 , quando o genótipo é β^0/β^0 , e hemoglobinas F e A_2 , com variável quantidade de hemoglobina A, quando o genótipo é β^0/β^+ ou β^+/β^+ . Alguns casos de talassemia intermédia têm porcentagem relativamente alta de hemoglobina A, enquanto outros têm quase exclusivamente hemoglobina F. Os estados heterozigóticos compostos para hemoglobina E e β -talassemia são diferenciados da talassemia maior por meio de HPLC ou eletroforese da hemoglobina.

β -Talassemia intermédia

β -talassemia intermédia refere-se a um fenótipo clínico com várias explicações genéticas [48].

O defeito genético pode ser a presença de dois alelos para β^+ -talassemia leve, co-herança de β -talassemia e hemoglobina E ou a presença de um único alelo para β -talassemia com um fator agravante, como a co-herança de α tríplice ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$). Há sintomatologia de anemia, geralmente esplenomegalia e, às vezes, deformidades ósseas. Em contrapartida à β -talassemia maior, entretanto, o paciente não é transfusão-dependente. A gravidade varia de uma condição que causa uma vida atribulada, nos limites da necessidade transfusional, a uma condição apenas discretamente mais severa do que a β -talassemia menor.

Hemograma

Há anemia microcítica moderadamente severa, com aspectos hematológicos similares aos do traço β -talassêmico, mas mais acentuados (Figuras 8.10 e 8.11). Policromatocitose e eritroblastos circulantes costumam estar presentes.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as β -talassemias menor e maior; o diagnóstico depende de critérios clínicos e aspectos laboratoriais.

Exames adicionais

HPLC ou eletroforese da hemoglobina mostram quantidade considerável de hemoglobina F. A porcentagem de hemoglobina A_2 está aumentada. Em alguns pacientes, há alguma hemoglobina A. Em casos com heterozigosidade composta para β -talassemia e hemoglobina E, estarão presentes hemoglobinas F, E e A_2 com ou sem alguma hemoglobina A.

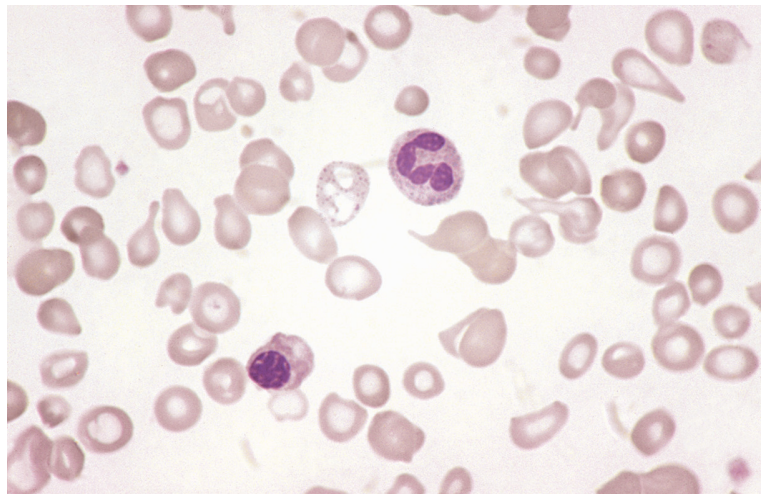


FIGURA 8.10 Distensão sanguínea de paciente com β -talassemia intermédia causada por homozigose para uma variante β -talassêmica leve.

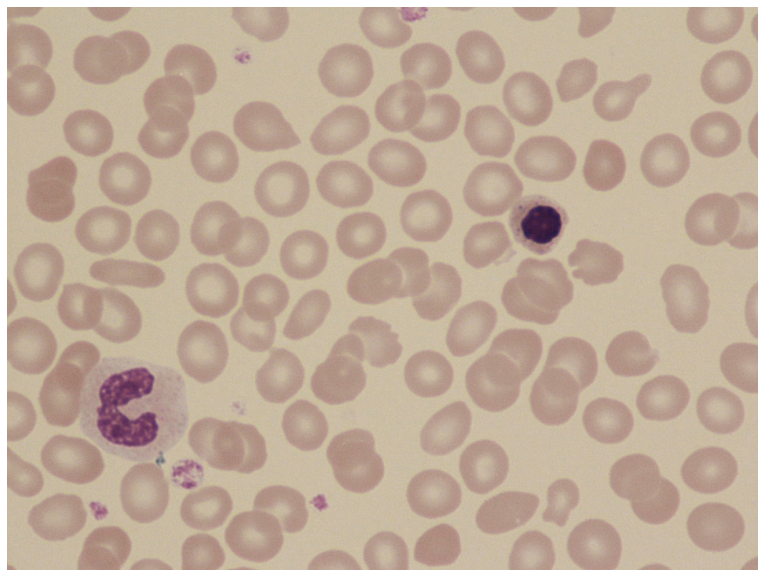


FIGURA 8.11 Distensão sanguínea de paciente com β -talassemia intermédia causada por heterozigose para β -talassemia co-herdada com duplicação dos α -genes ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) mostrando microcitose, anisocitose leve, e a presença de um microeritroblasto. O eritrograma mostrou: E $4,94 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 9,4 g/dL, Hct 30%, VCM 61 fL, HCM 19 pg, e CHCM 31,3 g/dL com hemoglobina A_2 5,8% e hemoglobina F 3,1%.

Distúrbios resultantes de defeito na síntese de cadeias globínicas α

Traço α -talassêmico

Indivíduos hematologicamente normais possuem quatro genes α . Traço α -talassêmico é um termo impreciso para designar deleção de um ou dois dos quatro genes α . O genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$ é denominado α^+ -talassemia. O genótipo $-\alpha/\alpha$ é denominado α^0 -talassemia. Homozigose para α^+ -talassemia, isto é, $-\alpha/-\alpha$, ou heterozigose para o traço α -talassêmico não deletional, muito mais raro, $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$, produz um fenótipo similar ao da α^0 -talassemia. A α -talassemia é comum em diversos grupos étnicos. A incidência é elevada em várias populações do Sudeste Asiático, particularmente tailandesas e chinesas, que possuem tanto o genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$ como o $-\alpha/\alpha$; este último também ocorre em gregos, cipriotas, turcos e sardenhos. Dentre os afro-americanos, 25-30% têm genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$ e 1-2%, genótipo $-\alpha/-\alpha$ [51]. Em jamaicanos, a prevalência é de aproximadamente 30 e 3%, respectivamente [52]. Em nigerianos, a prevalência é ainda maior, com 35% apresentando $-\alpha/\alpha\alpha$ e 8%, $-\alpha/-\alpha$ [53]. O genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$ ocorre em cerca de 7% dos gregos [54], e é comum em Chipre e em algumas regiões da Itália. Em determinadas ilhas do Pacífico, a prevalência de $-\alpha/\alpha\alpha$ chega a 85%.

Um fenótipo hematológico similar também é produzido por diversas hemoglobinas com variantes de cadeias α sintetizadas em ritmo muito reduzido, ocasionando o tipo não deletional de α -talassemia; a mais comum é a hemoglobina Constant Spring, que

não é rara no Sudeste Asiático e também é encontrada no Caribe, no entorno do Mediterrâneo, no Oriente Médio e no subcontinente indiano. Um fenótipo α -talassêmico também pode originar-se de algumas cadeias α instáveis, muito raras, que se degradam antes de completar-se a síntese da hemoglobina.

O traço α -talassêmico não tem consequências clínicas evidentes, mas pode ter significação genética.

Hemograma

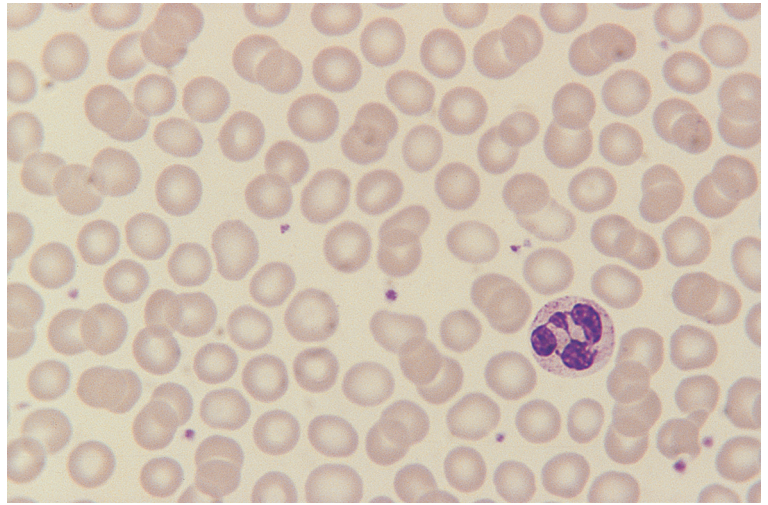
A α^0 -talassemia heterozigótica ($-\alpha/\alpha\alpha$) e a α^+ -talassemia homozigótica ($-\alpha/-\alpha$) ocasionam alterações hematológicas parecidas com as da β -talassemia menor (traço β -talassêmico), exceto pela raridade da presença de pontilhado basófilo e de células em alvo (Figura 8.12). Uma exceção é a α -talassemia não deletional da hemoglobina Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha$), em que há proeminente pontilhado basófilo. Na α^+ -talassemia heterozigótica ($-\alpha/\alpha\alpha$), as alterações hematológicas são insignificantes e geralmente não há alterações evidenciáveis à distensão sanguínea.

Os índices hematimétricos de indivíduos com apenas dois α -genes são próximos aos da β -talassemia menor. Os índices em indivíduos com deleção de um gene, isto é, com três α -genes em vez dos quatro usuais, costumam ser normais ou quase normais, no último caso sobrepondo-se em parte aos índices dos que têm apenas dois α -genes.

Diagnóstico diferencial

Os traços α -talassêmicos devem ser diferenciados do traço β -talassêmico e da deficiência de ferro.

FIGURA 8.12 Distensão sanguínea de indivíduo sadio, traço α -talassêmico, mostrando microcitose e leve hipocromia. As contagens (Coulter S) foram: E $6,24 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 14,1 g/dL, Hct 45%, VCM 72 fL, HCM 23 pg, CHCM 31,3 g/dL.



Exames adicionais

HPLC e eletroforese da hemoglobina são normais nos traços α -talassêmicos, exceto durante o período neonatal, quando é possível detectar uma pequena porcentagem de hemoglobina de Bart (γ_4) e de hemoglobina H (β_4). A hemoglobina Constant Spring pode ser detectada por HPLC e eletroforese, embora com dificuldade, pois a porcentagem em geral é baixa. Em adultos, deve-se suspeitar de traço α -talassêmico quando um paciente sem deficiência de ferro, pertencente a um grupo étnico apropriado, tem índices hematimétricos sugestivos de traço de talassemia, com HPLC e eletroforese da hemoglobina normais e porcentagem de hemoglobina A_2 normal ou baixa. A demonstração de inclusões de hemoglobina H em pequena porcentagem dos eritrócitos fortalece o diagnóstico; o exame, porém, é demorado e cansativo, e pode ser negativo, particularmente em heterozigotos, mas também em homozigotos para α^+ -talassemia. Quando o diagnóstico é importante, como no caso de aconselhamento genético em paciente de etnias do Sudeste Asiático, grega, turca e cipriota, torna-se necessária análise do DNA.

Hemoglobinopatia H

A ausência de três dos quatro genes α (genótipo $-/-\alpha$) ou distúrbio funcionalmente semelhante [40] causa a hemoglobinopatia H. Esta ocorre com maior frequência no Sudeste Asiático, incluindo tailandeses, chineses e indonésios, mas também é vista em gregos e cipriotas e, raramente, em outros grupos étnicos. As características clínicas são as de anemia hemolítica crônica, com esplenomegalia, às

vezes, hepatomegalia. Em pacientes com doença mais grave, podem ser notadas deformidades ósseas semelhantes às da β -talassemia maior. Dependência transfusional é incomum.

Hemograma

O diagnóstico da hemoglobinopatia H pode ser suspeitado a partir do hemograma. Há anemia, com Hb tipicamente entre 6 e 10 g/dL, que baixa mais na gravidez, em infecções intercorrentes e após exposição a drogas oxidantes. A distensão sanguínea (Figura 8.13) mostra hipocromia acentuada, microcitose e pecilocitose, incluindo eritrócitos em alvo, eritrócitos em lágrima e eritrócitos fragmentados. Há pontilhado basófilo, policromatocitose e reticulocitose. A herança concomitante de hemoglobinopatia H e eliptocitose (ver Figura 3.25) causa considerável pecilocitose, além de microcitose.

Os índices hematimétricos mostram diminuição acentuada do VCM e da HCM, e redução da CHCM, demonstrados pelo citograma (Figura 8.14). RDW e HDW estão aumentados.

Diagnóstico diferencial

A hemoglobinopatia H deve ser diferenciada da β -talassemia e das demais anemias hemolíticas e diseritropoéticas, especialmente piropecilocitose. A distensão sanguínea e os índices hematimétricos são muito mais alterados do que no traço β -talassêmico, mas podem ser semelhantes aos da β -talassemia intermédia; a alta contagem de reticulócitos e a usual ausência de eritroblastos na hemoglobinopatia H ajudam a diferenciá-la da β -talassemia

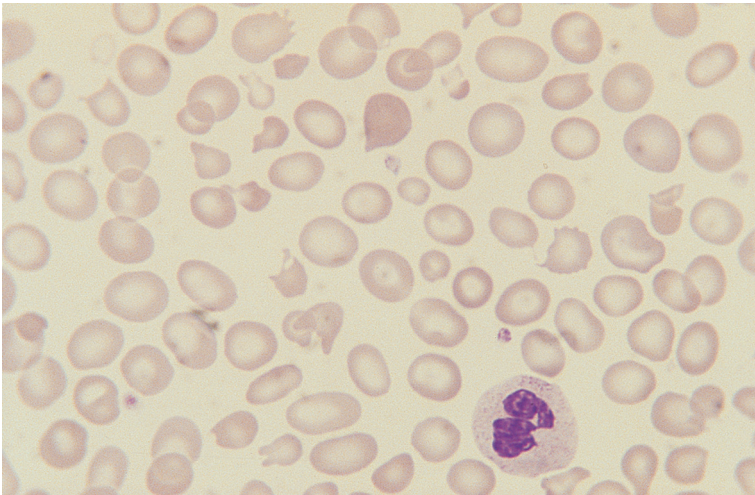


FIGURA 8.13 Distensão sanguínea de paciente com hemoglobinopatia H mostrando anisocitose, picilositose acentuada, microcitose e hipocromia. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $4,95 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 9,6 g/dL, Hct 30%, VCM 60,5 fL, HCM 19,4 pg, CHCM 32,1 g/dL, RDW 25,7%. A preparação para hemoglobina H correspondente é mostrada na Figura 7.2a.

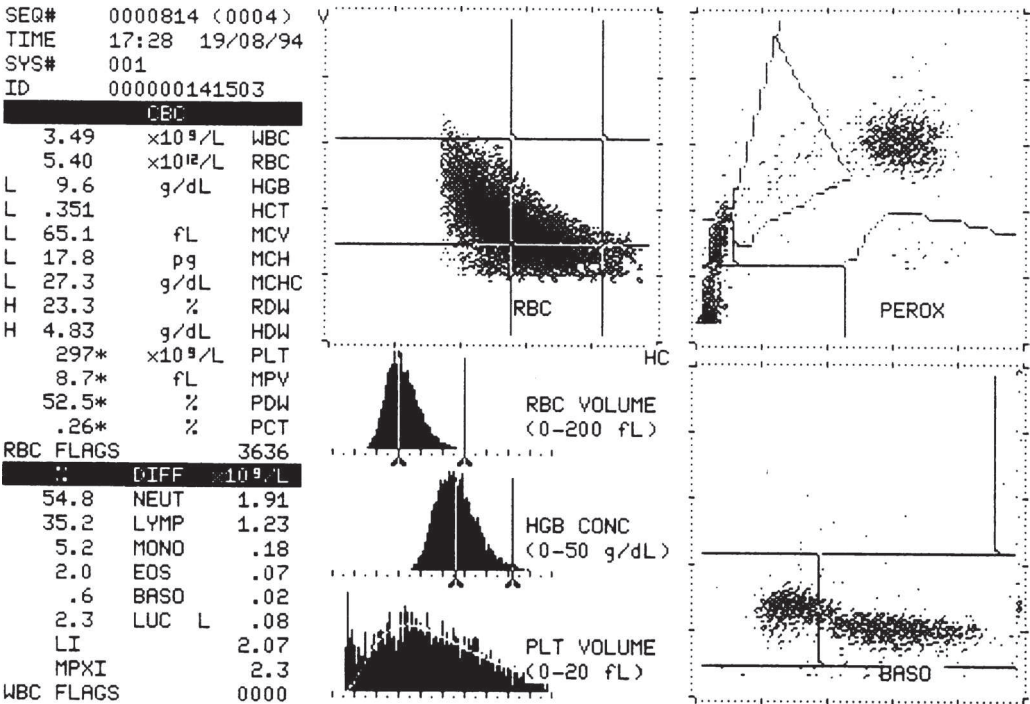
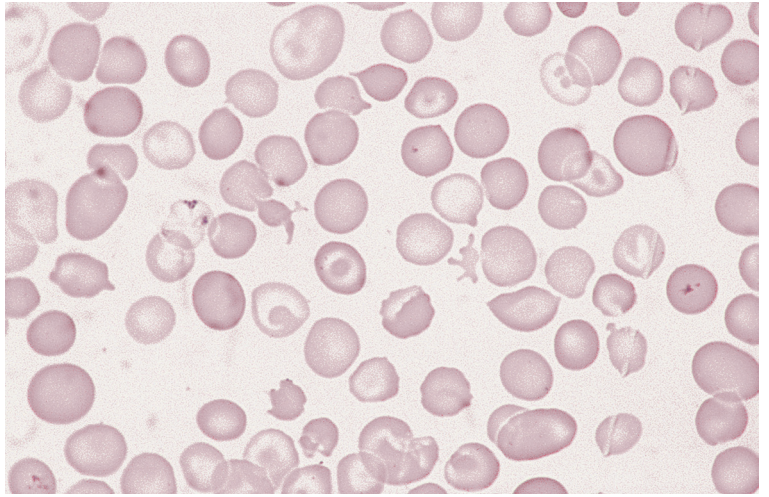


FIGURA 8.14 Scatter plots e histogramas de um paciente com hemoglobinopatia H, fornecidos pelo Bayer H.2. O citograma eritroide e os histogramas mostram hipocromia severa e microcitose. Os scatter plots leucocitários são normais.

intermédia. A CHCM está diminuída com qualquer método de determinação, ao passo que na β -talassemia menor a CHCM não está diminuída quando medida em contadores de impedância, mas está diminuída quando medida pelos instrumentos das séries Siemens H.1 e Advia. As anemias diseritropoéticas congênicas e a piropecilocitose hereditária podem mostrar um grau de picilositose

semelhante ao da hemoglobinopatia H. Nas anemias diseritropoéticas, entretanto, os eritrócitos são normocíticos ou macrocíticos, e não há reticulocitose. Na piropecilocitose, a distensão sanguínea mostra tipos específicos de picilócitos, como microesferócitos e eritrócitos com projeções semelhantes a brotos. A hemoglobinopatia H adquirida, que pode ser uma manifestação das SMDs, também deve ser

FIGURA 8.15 Distensão sanguínea de paciente com hemoglobinopatia H adquirida como parte de uma síndrome mielodisplásica, mostrando anisocitose, pecilocitose, microcitose, alguns eritrócitos hipocrômicos e eritrócitos em alvo. Um dos eritrócitos hipocrômicos contém corpúsculos de Pappenheimer. A contagem sanguínea foi: leucócitos $9,2 \times 10^3/\mu\text{L}$, Hb 10,2 g/dL, VCM 66 fL e plaquetas $53 \times 10^3/\mu\text{L}$. Cortesia da Dra. A. Hendrick, South Shields.



mencionada no diagnóstico diferencial da condição herdada; é diferenciada pela idade de apresentação, pela ausência de história familiar relevante e pela demonstração de outros sinais de mielodisplasia (Figura 8.15).

Exames adicionais

O diagnóstico é confirmado pela demonstração de inclusões de hemoglobina H nos eritrócitos (ver Figura 7.2) e pela HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram 2 a 40% de hemoglobina H. A eletroforese da hemoglobina também identificará casos em que há tanto hemoglobina Constant Spring como hemoglobina H, correspondentes ao genótipo $\alpha^{\text{CS}}\alpha/-$ ou $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{CS}}\alpha$, com características clínicas e hematológicas semelhantes às da

hemoglobinopatia H deletional, mas, como regra, um pouco mais graves.

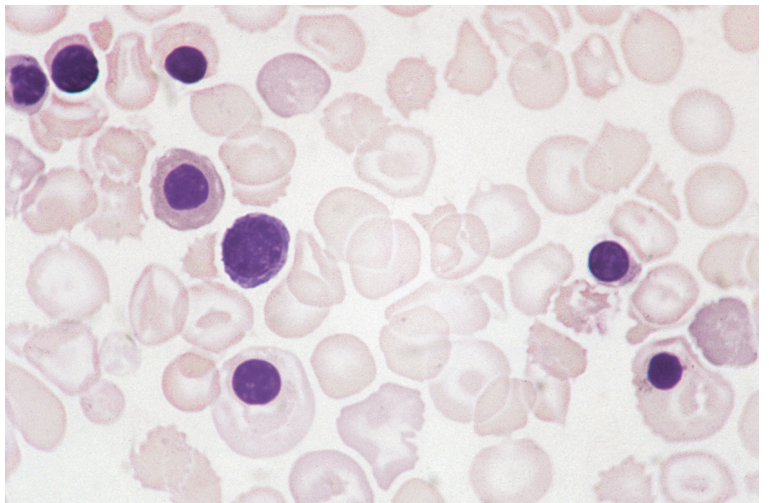
Hidropisia fetal da hemoglobina de Bart

A hidropisia fetal da hemoglobina de Bart é uma síndrome decorrente da ausência dos quatro genes α (α -genótipo $-/-$), que resulta na falta total de síntese de cadeias α . O resultado é extrema anemia, hematopoese extramedular, hipoalbuminemia e edema, causando morte fetal ou morte neonatal de um feto hidrópico.

Hemograma

Há anemia, severa e a distensão sanguínea (Figura 8.16) mostra considerável hipocromia, pecilocitose e eritroblastose.

FIGURA 8.16 Distensão sanguínea de recém-nascido com hidropisia fetal por hemoglobina de Bart mostrando anisocitose, pecilocitose e numerosos eritroblastos. Cortesia da Dra. Mary Frances McMullin, Belfast.



Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui as demais causas de anemia grave no feto (ver Tabela 6.20) e outras causas de hidropisia fetal.

Exames adicionais

O diagnóstico é confirmado pela demonstração do traço α^0 -talassêmico em ambos os genitores, e por HPLC ou eletroforese da hemoglobina, mostrando apenas as hemoglobinas de Bart, H e Portland. Diagnóstico no começo da gravidez, permitindo a interrupção precoce, pode ser feito por análise molecular de células fetais obtidas por coleta das vilosidades coriônicas.

Hemoglobinopatias

São anormalidades hereditárias da síntese de cadeias globínicas da hemoglobina. Alguns hematologistas usam esse termo em sentido amplo, que abrange todas as anormalidades, incluindo as talassemias. Outros classificam os distúrbios da síntese das cadeias globínicas como “hemoglobinopatias” quando existe uma anormalidade estrutural e como “talassemias” quando a principal anormalidade é a redução na velocidade de síntese de uma das cadeias globínicas. Há, necessariamente, certo grau de sobreposição entre as “hemoglobinopatias” e as “talassemias”, pois algumas hemoglobinas anormais (como a hemoglobina E) são sintetizadas a uma velocidade reduzida. Nas talassemias, também podem ser formadas hemoglobinas anormais, em consequência da síntese desequilibrada das cadeias, como a hemoglobina H e a hemoglobina de Bart em várias síndromes α -talassêmicas. A posição mais conveniente é a que admite a talassemia como um subtipo de hemoglobinopatia. Hemoglobinopatias (incluindo talassemias) resultam de mutações nos genes que codificam as cadeias α , β , γ e δ da hemoglobina. Mutações dos genes α produzem anormalidades que afetam as hemoglobinas A, A_2 e F. Mutações dos genes β afetam a hemoglobina A; mutações nos genes γ , a hemoglobina F; e mutações nos genes δ , a hemoglobina A_2 . Somente mutações que afetam os genes α e β são importantes na vida adulta.

Anemia de células falciformes (ou drepanocitose)

Anemia de células falciformes (ou drepanocitose,* do grego = foicinha) é a doença causada pela homozigose para uma variante da cadeia β da hemoglobina, a hemoglobina S (do inglês, *sickle* = foicinha).

O genótipo é β^S/β^S . O termo “síndrome falcêmica” é usado de modo mais amplo: inclui todas as condições nas quais há afoiçamento dos eritrócitos, como a drepanocitose/ β -talassemia, a drepanocitose/hemoglobinopatia C e, inclusive, quando há afoiçamento sem anemia, como no traço falciforme ou drepanocítico.

A hemoglobina S tende a polimerizar em condições de baixa tensão de oxigênio, levando o eritrócito a assumir formato de foicinha (ou banana) e tornando-o menos deformável. Há alterações associadas na membrana dos eritrócitos e nas células endoteliais; a resultante obstrução dos pequenos vasos sanguíneos leva a infarto tecidual, responsável pela característica clínica dominante da doença – as crises dolorosas recorrentes, afetando os dedos das mãos e dos pés (em crianças pequenas), os membros, o abdômem e o tórax. Outras características clínicas são a anemia, causada principalmente pelo encurtamento da sobrevida eritroide, e a esplenomegalia, presente somente durante a infância, pois é seguida de infartos esplênicos e fibrose, causando hipoesplenismo.

O gene β^S – e, portanto, a anemia de células falciformes tem sua maior prevalência em indivíduos de etnia africana, mas também ocorre em indianos, gregos, italianos, turcos, cipriotas, espanhóis, árabes, norte-africanos, em populações centro e sul-americanas e do subcontinente indiano.

Hemograma

Na anemia de células falciformes [55], a Hb é geralmente da ordem de 7-8 g/dL, mas com limites entre 4 e 11 g/dL ou até mais amplos. Os níveis mais altos de Hb são característicos dos casos em populações árabes. A distensão sanguínea típica (Figura 8.17) mostra anisocitose, anisocromasia, eritrócitos falciformes (drepanócitos), eritrócitos em formato de barco (com ambas as extremidades em ponta, mas não em formato de crescente), eritrócitos em alvo, policromatofilia, pontilhado basófilo, eritroblastos, ocasionais células irregularmente contraídas e esferócitos. O microscópio eletrônico de varredura mostra o aspecto falciforme característico (ver Figura 3.56); às vezes, são vistos fragmentos lineares de eritrócitos falciformes (ver Figura 3.50). Passada a primeira infância, surgem sinais de hipoesplenismo: corpos de Howell-Jolly, corpúsculos de Pappenheimer e eritrócitos em alvo mais numerosos; acantócitos, em geral presentes no hipoesplenismo, não são vistos na anemia de células falciformes. A contagem de reticulócitos é, em geral, 10-20%. As contagens de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas, em comparação com controles dos mesmos grupos étnicos, costumam ser

*N de T. O termo *drepanocitose* é muito usado no Brasil, principalmente nos termos compostos que designam as demais síndromes falcêmicas.

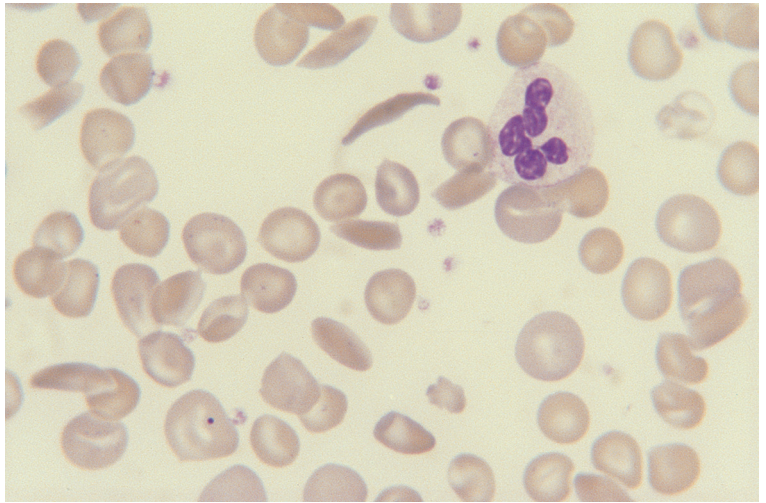


FIGURA 8.17 Distensão sanguínea de paciente com anemia de células falciformes (drepanocitose) mostrando anisocitose, poecilocitose, um drepanócito, vários eritrócitos em formato de barco e um eritrócito contendo um corpo de Howell-Jolly.

um pouco elevadas e tendem a aumentar com a idade [56]. Monócitos e neutrófilos podem conter, ocasionalmente, eritrócitos fagocitados.

Ao nascimento, quando há apenas uma pequena quantidade de hemoglobina S, a Hb, os índices hematimétricos e as contagens são normais. A distensão sanguínea é normal, salvo pela presença ocasional de drepanócitos, mesmo em recém-nascidos. As anormalidades hematológicas aparecem durante o primeiro ano de vida [57, 58]. A Hb cai abaixo dos limites de referência entre o primeiro e o sexto meses de idade. Alguns drepanócitos e outros sinais da doença aparecem entre o quarto e o sexto meses; os sinais de hipoesplenismo geralmente aparecem entre o nono e o décimo segundo meses, mas às vezes já estão presentes no sexto mês. Sinais de hipoesplenismo surgem na época em que é detectada a esplenomegalia. No primeiro ano de vida, o hipoesplenismo pode ser revertido por meio de reposição transfusional; posteriormente, isso não é possível. Eritroblastos só passam a ser comuns no sangue após os 12 meses de idade.

Alguns indivíduos, embora homozigotos para β^S , têm Hb normal ou quase normal e poucos sinais ou sintomas de anemia de células falciformes; são principalmente árabes, com uma porcentagem involuntariamente alta de hemoglobina F, o que melhora a condição. Nesses indivíduos, as alterações morfológicas da distensão sanguínea podem, também, ser discretas. Quando o traço α -talassêmico coexiste com anemia de células falciformes, há diferenças sutis nos índices hematimétricos, mas apenas quando são avaliados grupos de pacientes. A distinção individual, apenas pelo quadro hematológico, é impossível. No grupo com coexistência de traço

α -talassêmico, a Hb e a contagem de eritrócitos médias são mais altas, ao passo que o VCM, a HCM, a CHCM, a contagem de reticulócitos, o grau de policromatofilia e o número de eritrócitos falciformes são, em média, menores. Tratamento com hidroxycarbamida causa (Hydrea®) aumento do VCM e da HCM e reduz o grau de alterações à microscopia.

Durante as crises dolorosas, há leucocitose, predominantemente neutrófila, às vezes até da ordem de $40-50 \times 10^3/\mu\text{L}$, pequena queda na Hb e aumento da policromatofilia, do número de eritroblastos e da contagem de reticulócitos. Ocorre aumento do número de drepanócitos na distensão sanguínea, mas o reconhecimento desse dado requereria uma contagem cuidadosa e o conhecimento dos valores basais de cada paciente. Eritrócitos irregularmente contraídos são muito mais numerosos durante episódios de infarto pulmonar com hipoxia.

Em consequência do encurtamento da sobrevida eritroide, pacientes com anemia de células falciformes tendem a apresentar agravamento agudo da anemia quando se desenvolvem complicações ou são acometidos por outras doenças; o hemograma pode fornecer elementos sugestivos da causa. Na sequestração esplênica aguda, restrita a crianças de menos de 3 anos de idade, há queda súbita da Hb e da contagem de plaquetas; subsequentemente, ocorre aumento da policromatofilia e da reticulocitose, além de aumento do número de eritroblastos. Em pacientes mais velhos, a sequestração aguda pode ocorrer no fígado em vez de no baço. No infarto da medula óssea, é possível ocorrer queda da contagem de leucócitos e de plaquetas, reação leucoeritroblástica proeminente, e podem ser vistos alguns megacariócitos circulantes. Na infecção por parvovírus B19,

que causa hipoplasia eritroide passageira, leucócitos e plaquetas raramente são afetados; há desaparecimento dos eritroblastos e da policromatofilia, e a contagem de reticulócitos torna-se muito baixa. Durante a fase de recuperação, aparece profusão de eritroblastos, e há neutrofilia e volta da reticulocitose. A supressão da produção de reticulócitos é geralmente menor quando outras infecções levam ao desenvolvimento de anemia, com características de ADC. Na anemia megaloblástica devida à deficiência de folatos, podem ser vistos alguns megaloblastos circulantes, macrócitos e neutrófilos hipersegmentados. A contagem de reticulócitos diminui. Na crise torácica, caem a Hb e a contagem de plaquetas; quando esta se mostra inferior a $200 \times 10^3/\mu\text{L}$, é indicativa de prováveis complicações adicionais [59]. Em pacientes com hiper-hemólise, após tratamento transfusional pode ser notada eritrofagocitose na distensão sanguínea [60]. A presença de estromas eritrocíticos pode alertar o hematologista para hemólise por concomitância de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase [61].

O eritrograma fornecido pelos instrumentos eletrônicos na anemia de células falciformes mostra redução de E, Hb e Hct. O VCM é normal ou elevado, mas o aumento não é proporcional ao aumento

decorrente da constante reticulocitose [62], o que pode ser considerado como uma microcitose relativa. RDW e HDW estão aumentados. Os citogramas eritroides fornecidos pelas séries Siemens H.1 (Figura 8.18) e Advia (Figura 8.19) mostram uma população de células densas representando células irreversivelmente afoiçadas e uma população de células hipodensas representando reticulócitos. Embora sejam detectados eritrócitos hiperdensos, sua porcentagem pode ser subestimada, pois os eritrócitos irreversivelmente falciformes não são capazes de se tornarem esféricos, como deveria ocorrer para permitir a medição nesses instrumentos [51, 63]. Contadores de impedância não conseguem detectar o aumento da CHCM das células mais densas [63]. Ocorrem novas alterações nos índices hematimétricos durante as crises dolorosas; às vezes, 1-3 dias antes delas [64]. A leve queda da Hb e o aumento da contagem de reticulócitos são acompanhados por novos aumentos do RDW e do HDW. Há aumento da CHCM e da porcentagem de eritrócitos anormalmente densos.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a drepanocitose/hemoglobinopatia C (hemoglobinopatia S/C) (ver seguir) e com a

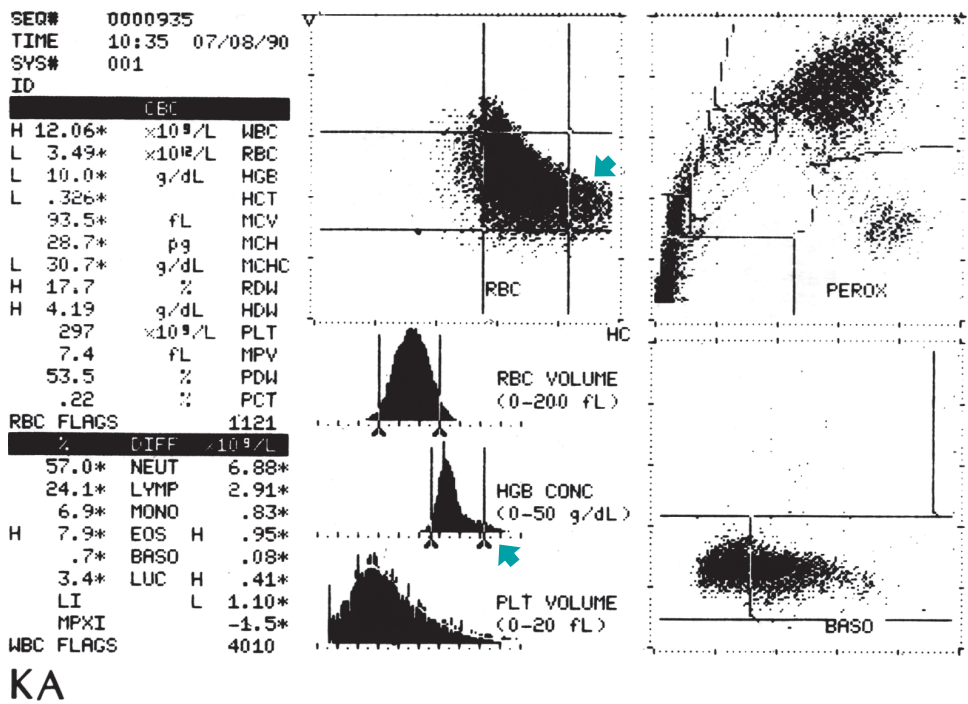


FIGURA 8.18 Scatter plots dos eritrócitos e histogramas de um paciente com anemia de células falciformes (drepanocitose), fornecidos pelo Bayer H.1; a presença de células com conteúdo aumentado de hemoglobina é aparente no citograma e no histograma da concentração de hemoglobina (setas verdes).

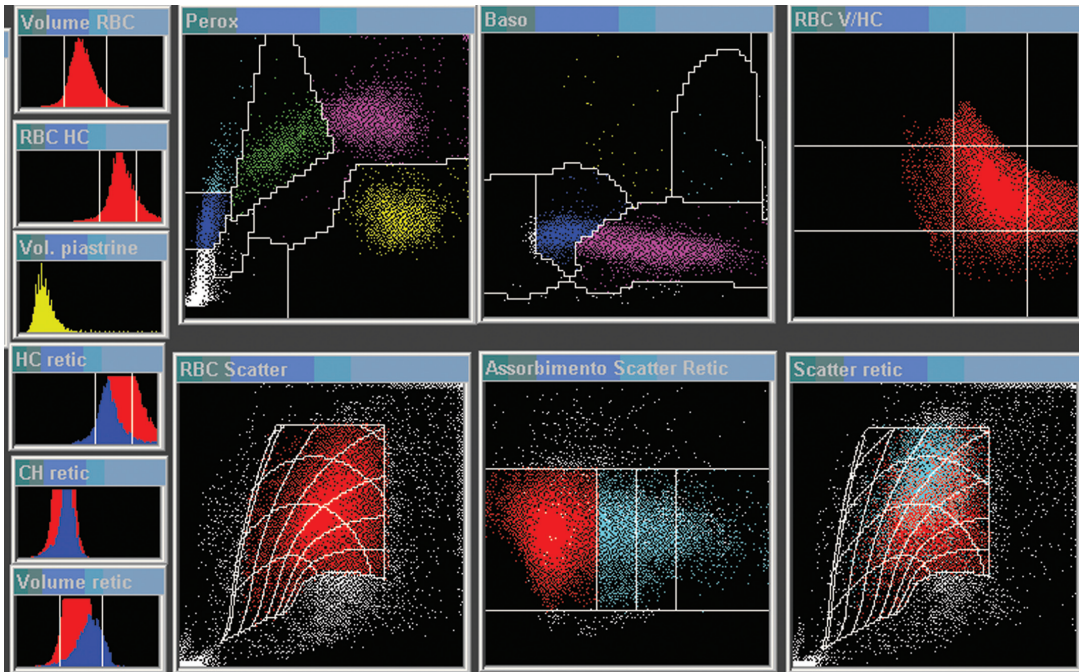


FIGURA 8.19 Citograma e histogramas da série Siemens Advia de paciente com anemia de células falciformes (drepanocitose). O hemograma mostrava: leucócitos $9,3 \times 10^3/\mu\text{L}$, E $3,07 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 9,4 g/dL, Hct 27%, VCM 87,9 fL, HCM 30,6 pg, CHCM 34,9 g/dL, média das concentrações hemoglobínicas corpusculares (MCCH) 36,5 g/dL, RDW 19,7%, plaquetas $575 \times 10^3/\mu\text{L}$, reticulócitos 18,5% = $568 \times 10^3/\mu\text{L}$. O citograma eritroide (RBC Scatter) e os dois histogramas de concentração hemoglobínica (RBC HC e RBC V/H) mostram um aumento de células com concentração hemoglobínica aumentada (ultrapassando para a direita os limiares verticais direitos). Havia um *flag* +++ para hipercromia e também um *flag* para presença de eritroblastos. O *scatter plot* de reticulócitos mostra aumento tanto de reticulócitos maduros, como intermediários e imaturos (pontilhado turquesa). Note-se que há uma eosinofilia incidental ($18,9\% = 1,76 \times 10^3/\mu\text{L}$). Cortesia da Professora Gina Zini, Roma.

drepanocitose/ β^0 -talassemia. A drepanocitose/ β^0 -talassemia não pode ser distinguida da anemia de células falciformes pela HPLC ou pela eletroforese da hemoglobina, uma vez que a hemoglobina A está ausente em ambas as condições. A distinção é feita por meio de exames nos familiares e pelo achado de valores mais baixos do VCM e da HCM nesse estado heterozigótico composto. A drepanocitose/ β^+ -talassemia pode mostrar hemograma menos alterado, dependendo da quantidade de hemoglobina A presente; HPLC ou eletroforese da hemoglobina são diagnósticas. Heterozigose composta para hemoglobina S e persistência hereditária da hemoglobina fetal podem ser diferenciadas pelo fenótipo clínico e hematológico mais brando, por exames dos familiares e pela HPLC ou eletroforese da hemoglobina. O traço falciforme não se confunde com a anemia de células falciformes, visto que a Hb é normal e não há drepanócitos na distensão sanguínea; contudo, os heterozigotos para algumas variantes raras, como a Hb S-Antilhas, podem apresentar eritrócitos falciformes nas distensões sanguíneas de rotina [65], e

heterozigotos para a hemoglobina S-Oman têm células em chapéu de Napoleão características – amplas no centro, mas com extremidades pontudas.

Exames adicionais

O diagnóstico requer teste de solubilidade para a hemoglobina S e HPLC ou eletroforese da hemoglobina; quando há óbvios eritrócitos falciformes na distensão sanguínea, o teste de solubilidade é redundante. A hemoglobina S predomina, há quantidades menores de hemoglobinas F e A_2 e ausência de hemoglobina A. A hemoglobina F varia de 2 a 15%, e a hemoglobina A_2 pode estar minimamente elevada. Se eletroforese da hemoglobina for o método usado, é aconselhável fazê-la em pH ácido e em pH alcalino, a fim de distinguir a anemia de células falciformes (S/S) de estados heterozigóticos compostos S/D-Punjab (S/D-Los Angeles) e S/Lepore; ambas migram com a S em pH alcalino e com a A em pH ácido. Se a técnica escolhida for HPLC, essas duas hemoglobinas não se confundem com a hemoglobina S. Em lactentes, a porcentagem

de hemoglobina S pode ser muito baixa para posicionar o teste de solubilidade; o diagnóstico baseia-se, então, na HPLC, com confirmação por eletroforese ou foco isoelétrico ou por eletroforese em pH ácido e alcalino.

Testes para anemia de células falciformes e demais síndromes falcêmicas são recomendados para todos os recém-nascidos das origens étnicas apropriadas, pois educação dos pais e tratamento profilático com penicilina reduzem significativamente a mortalidade. No Reino Unido (e no Brasil), é rotineiramente feito no período neonatal o “teste do pezinho” (teste de Guthrie), em gota de sangue seca em papel-filtro, que inclui análise da hemoglobina.

Traço falciforme (ou drepanocítico)

O traço falciforme (ou traço drepanocítico) indica a heterozigose para β^S (genótipo β/β^S), de modo que estão presentes hemoglobina S e hemoglobina A. O traço falciforme é quase sempre assintomático, mas é importante do ponto de vista genético, bem como em situações em que haja possibilidade do paciente sofrer hipoxia. Pacientes ocasionais têm manifestações clínicas, como hematúria, perda de capacidade de concentração renal, ou infarto esplênico em altitudes elevadas.

Hemograma

A distensão sanguínea costuma ser normal, mas pode mostrar microcitose ou eritrócitos em alvo. Embora não sejam vistos eritrócitos falciformes clássicos, pode haver pequeno número de eritrócitos com duas extremidades pontiagudas, mas centro cheio [66]; essas células são vistas em cerca de 96% dos indivíduos com traço falciforme e em apenas 4% das pessoas normais. Eritrócitos falciformes legítimos só são vistos muito raramente. Há um caso relatado de presença de numerosos eritrócitos falciformes no sangue de paciente com leucemia linfoblástica aguda e contagem de leucócitos muito alta; o fenômeno foi atribuído ao consumo *in vitro* de oxigênio pelas células leucêmicas [67].

Os parâmetros hematimétricos são normais ou há discreta redução do VCM e da HCM. Redução do VCM é mais comum em negros com traço falciforme do que em negros em geral [68]. A diferença parece dever-se a uma incidência um pouco mais alta do traço α -talassêmico em indivíduos com traço falcêmico [69], pois não se nota diferença entre os índices hematimétricos de indivíduos com e sem traço falcêmico quando são excluídos da análise os portadores de anemia ferropênica e de traço α -talassêmico [70].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir principalmente as demais causas de microcitose (ver Tabela 3.1) e de formação de eritrócitos em alvo (ver Tabela 3.7).

Exames adicionais

Não se pode contar com o hemograma para estabelecer o diagnóstico. Há necessidade de HPLC ou eletroforese da hemoglobina (que mostram as hemoglobinas A e S, sendo a porcentagem de A maior do que a de S) e teste de solubilidade para a hemoglobina S (que mostra que a hemoglobina anormal é mesmo S, e não outra anormal com a mesma mobilidade). A hemoglobina S costuma corresponder a 25 a 45% da hemoglobina total. O diagnóstico do traço falcêmico não deve ser excluído apenas pela negatividade do teste de solubilidade; se isso for feito em emergência – como antes de uma anestesia – o teste deve ser seguido por HPLC ou eletroforese para confirmar a negatividade. Nos 6 primeiros meses de vida, quando a porcentagem da hemoglobina S pode ser muito baixa para positivar um teste de solubilidade, o diagnóstico requer dois métodos independentes para confirmar a natureza da variante hemoglobínica, por exemplo, (i) HPLC, suplementada por foco isoelétrico ou eletroforese, ou (ii) eletroforese em pH ácido e pH alcalino.

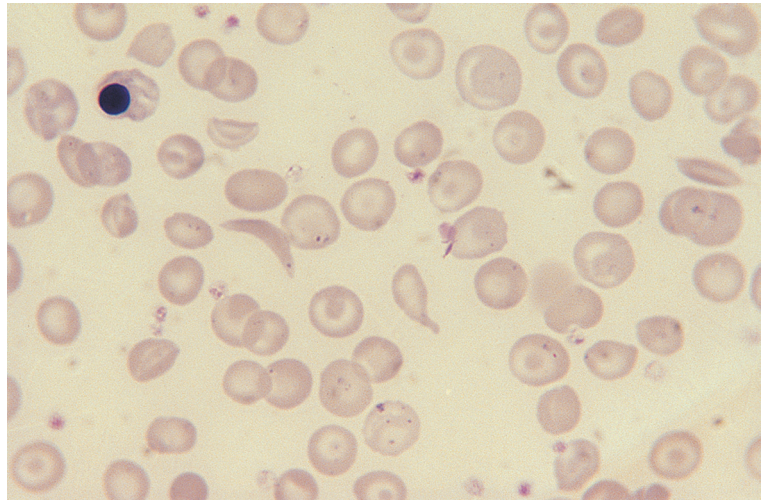
Drepanocitose/ β -talassemia

Pacientes heterozigóticos para hemoglobina S e β^0 ou β^+ -talassemia não podem ser distinguidos com segurança de pacientes com anemia de células falciformes apenas por dados clínicos, embora os que portam β^S/β^+ -talassemia costumem mostrar doença mais benigna e manter esplenomegalia além da primeira infância.

Hemograma

O hemograma não distingue com segurança heterozigotos compostos para hemoglobina S e β -talassemia de homozigotos para hemoglobina S, particularmente se estes portarem também um gene α -talassêmico, mas, quando os pacientes são considerados como um grupo, há diferenças. Pacientes com β^S/β^0 -talassemia mostram microcitose e hipocromia mais intensas do que as habitualmente observadas na anemia de células falciformes, e os corpúsculos de Pappenheimer costumam ser mais proeminentes (Figura 8.20). De resto, o aspecto das distensões sanguíneas é o mesmo. As anormalidades nas distensões sanguíneas de heterozigotos compostos para β^S/β^+ -talassemia são menos pronunciadas, dependendo dos níveis das hemoglobinas A e F; eritrócitos em alvo são mais numerosos e células falciformes, menos frequentes.

FIGURA 8.20 Distensão sanguínea de paciente com heterozigose composta drepanocitose/ β^0 -talassemia mostrando anisocitose, pecilocitose, um drepanócito, um eritrócito em formato de barco e um eritroblasto. Vários eritrócitos contêm corpúsculos de Pappenheimer.



Quando há esplenomegalia persistente, podem ocorrer leucopenia e trombocitopenia, como consequência de hiperesplenismo.

As contagens sanguíneas nos heterozigotos compostos, em particular naqueles com β^S/β^+ -talassemia, mostram, como grupo, valores mais altos de E, Hb e Hct e valores mais baixos de VCM, HCM, CHCM, porcentagem e contagem absoluta de reticulócitos [71, 72].

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita com a anemia de células falciformes (drepanocitose) e com a drepanocitose/hemoglobinopatia C.

Exames adicionais

O diagnóstico da β^S/β^+ -talassemia pode ser confirmado por HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram hemoglobinas S e A; no entanto, em contrapartida ao traço drepanocítico, a porcentagem de S é maior do que a de A. A hemoglobina F também pode estar aumentada, mas geralmente não ultrapassa 10-15%. A β^S/β^0 -talassemia não pode ser distinguida da drepanocitose (β^S/β^S) por meio de HPLC ou eletroforese da hemoglobina, uma vez que em nenhuma das condições existe hemoglobina A. O diagnóstico dos casos com microcitose e hemoglobinas S e F requer exame dos familiares e, se necessário, análise do DNA.

Heterozigose composta para hemoglobina S/persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF)

Pacientes com heterozigose composta para hemoglobina S e PHHF delecional, genótipo β^S/PHHF ,

apresentam uma condição clínica branda, na qual as crises dolorosas são raras ou ausentes.

Hemograma

A hemoglobina é normal. Os eritrócitos são normocíticos e normocrômicos e não costuma haver sinais de hipoesplenismo. Há anisocitose, eritrócitos em alvo e raros drepanócitos.

As contagens sanguíneas são normais ou muito pouco alteradas.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a anemia de células falciformes e com a drepanocitose/ β -talassemia. A distensão sanguínea mostra-se muito menos alterada do que em qualquer das duas condições.

Exames adicionais

HPLC ou eletroforese da hemoglobina mostram hemoglobinas S e F. A hemoglobina F constitui 20-30% da hemoglobina total. A porcentagem de hemoglobina F é maior do que na heterozigose composta para a drepanocitose/ β -talassemia, cujos níveis de hemoglobina F são sempre inferiores a 15%. A porcentagem de hemoglobina F também é maior do que na anemia de células falciformes, na qual são habitualmente encontrados níveis de 0,5-15%, embora níveis intermediários estejam presentes em alguns pacientes árabes com anemia de células falciformes, bem como em pacientes em tratamento com hidroxycarbamida.

Drepanocitose/hemoglobinopatia C

A hemoglobina C é uma variante de cadeia β originada na África Ocidental, a oeste do rio Níger;

é encontrada, também, em afro-caribenhos e afro-americanos e, mais raramente, em outros grupos étnicos, como norte-africanos, sicilianos, italianos e espanhóis. Heterozigotos compostos para hemoglobina S e hemoglobina C, genótipo β^S/β^C , apresentam síndrome falcêmica de gravidade variável, desde uma forma quase assintomática até uma forma de gravidade comparável à da anemia de células falciformes. Esplenomegalia surge na infância e pode persistir até a idade adulta. Anormalidades da retina e necrose isquêmica de ossos longos são mais frequentes do que na anemia de células falciformes.

Hemograma

Na drepanocitose/hemoglobinopatia C, a Hb é mais alta do que na anemia de células falciformes, com pouca sobreposição, com níveis de 8 a 14 g/dL em mulheres, e de 8 a 17 g/dL em homens [71]. A drepanocitose/hemoglobinopatia C pode, geralmente, ser distinguida da drepanocitose pela distensão sanguínea (Figura 8.21), embora nem sempre seja possível distingui-la da hemoglobinopatia C homozigótica [73]. As células falciformes são escassas e, em comparação com a anemia de células falciformes, há menor número de eritroblastos, menor policromatocitose e menos evidências de hipoesplenismo, cujo desenvolvimento tende a ser mais tardio. Há muitos eritrócitos em alvo e eritrócitos em formato de barco. Eritrócitos irregularmente contraídos são mais numerosos, e muitos pacientes têm um tipo peculiar de pecilócito – pecilócito SC – específico da drepanocitose/hemoglobinopatia C. Os pecilócitos SC lembram os drepanócitos por serem densos e apresentarem certo grau de curvatura, mas diferem deles por possuírem bordas mais retas ou serem angulados

ou ramificados [73, 74]. Esses pecilócitos específicos podem estar presentes em grande número, mas, na maioria dos casos, são pouco frequentes. Raros eritrócitos contendo cristais de hemoglobina C podem ser vistos em uma minoria de pacientes.

Em pacientes heterozigotos tanto para α^G -Filadélfia como para β^S e β^C , os aspectos diferem [54]. Os cristais de hemoglobina C são mais longos e, quando se rompe a membrana celular, mostram cristas e estrias, assemelhando-se a uma cana-de-açúcar.

Pode haver queda súbita da hemoglobina, resultante de anemia megaloblástica sobreposta, necrose da medula óssea ou aplasia eritroide pura induzida por parvovírus B19. Anemia megaloblástica e necrose da medula óssea são particularmente frequentes durante a gravidez. Quando se suspeita dessas condições como complicação da drepanocitose/hemoglobinopatia C, devem ser procuradas as mesmas características descritas para a anemia de células falciformes.

E, Hb e Hct são mais altos do que na anemia de células falciformes. O VCM é em geral inferior e pode estar abaixo dos limites de referência, mesmo em pacientes sem coexistência de traço α -talassêmico [76]. A CHCM é mais alta do que na drepanocitose, frequentemente acima do limite de referência, e os citogramas identificam uma população de células hiperdensas. RDW e HDW estão aumentados. A contagem de reticulócitos é mais baixa, em média 3%, em contrapartida os 10% encontrados na drepanocitose [55].

As contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos são mais altas do que nos controles em populações negras [56].

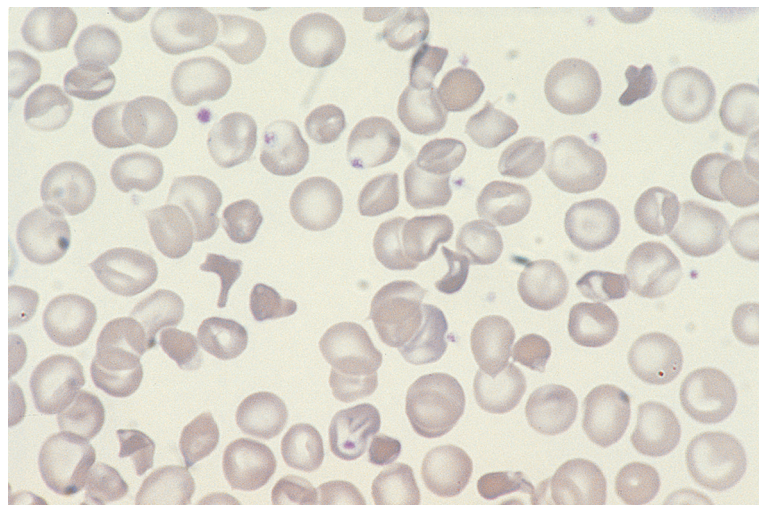
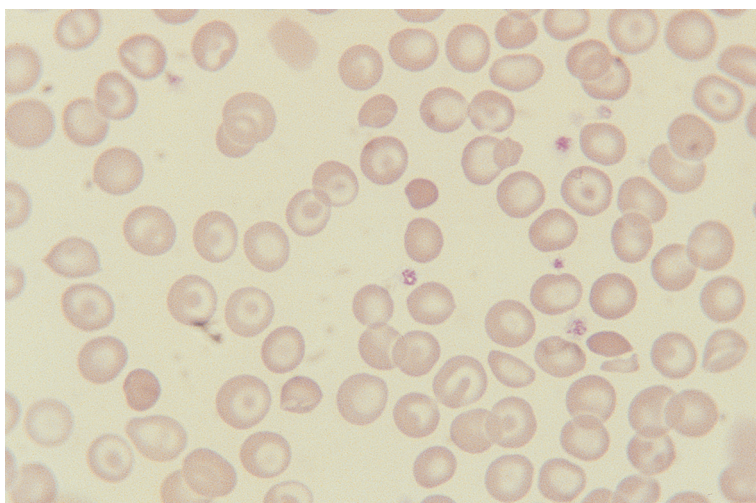


FIGURA 8.21 Distensão sanguínea de paciente com heterozigose composta para drepanocitose/hemoglobinopatia C mostrando vários pecilócitos SC específicos.

FIGURA 8.22 Distensão sanguínea de paciente com hemoglobinopatia C mostrando células irregularmente contraídas e eritrócitos em alvo.



Hemoglobinopatia C

Homozigotos para hemoglobina C, genótipo β^C/β^C , têm hemólise crônica e, em geral, anemia hemolítica. Há esplenomegalia e incidência aumentada de cálculos biliares.

Hemograma

Costuma haver anemia leve a moderada. A distensão sanguínea mostra grande número de eritrócitos em alvo e de células irregularmente contraídas (Figura 8.22); estas lembram esferócitos, mas uma inspeção mais rigorosa mostra que a maioria tem formato irregular. Costuma haver policromatocitose, e eritroblastos não são raros. Em alguns pacientes, há hipocromia e microcitose. Cristais de hemoglobina C não são comuns, porém, quando presentes, são suficientemente característicos para confirmar a presença dessa hemoglobina; são romboides, com lados paralelos e extremidades triangulares ou obliquamente inclinadas (ver a seguir). Estão em geral contidos em um eritrócito que parece desprovido de hemoglobina. Uma minoria dos pacientes apresenta alterações sanguíneas menos evidentes, com baixo número de eritrócitos em alvo e de eritrócitos irregularmente contraídos.

E, Hb e Hct são normais ou moderadamente reduzidos. Costuma haver acentuada redução do VCM e da HCM, com aumento da CHCM [76]. A baixa do VCM e da HCM ocorre mesmo sem coexistência de traço α -talassêmico. RDW e HDW estão aumentados, e os citogramas mostram uma população de células hiperdensas. A contagem de reticulócitos está aumentada.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui drepanocitose/hemoglobinopatia C e heterozigose composta para hemoglobina C e β -talassemia. A distensão sanguínea no traço da hemoglobinopatia C pode mostrar alterações que lembram os casos mais leves de hemoglobinopatia C homozigótica.

Exames adicionais

O exame da distensão sanguínea leva à suspeita diagnóstica, mas a confirmação requer teste de solubilidade (negativo) e HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram hemoglobinas C, A_2 (que não pode ser distinguida facilmente da C em eletroforese em acetato de celulose, mas que se distingue em eletroforese capilar) e pequena quantidade de hemoglobina F. Em casos microcíticos, são necessários exames dos familiares ou de genética molecular, a fim de diferenciar a hemoglobinopatia C da heterozigose composta para hemoglobina C/ β^0 -talassemia. Se o teste de rotina usado for eletroforese da hemoglobina, será necessário um segundo método para distinguir SC de S-O-Arab, porque a hemoglobina O-Arab migra com a hemoglobina C em pH alcalino.

Traço da hemoglobinopatia C

O traço da hemoglobinopatia C, genótipo $\beta\beta^C$, é uma anormalidade assintomática sem outro significado, a não ser a possibilidade de doença mais grave na prole.

Hemograma

A Hb é normal. A distensão sanguínea (Figura 8.23) pode ser normal ou mostrar eritrócitos em alvo,

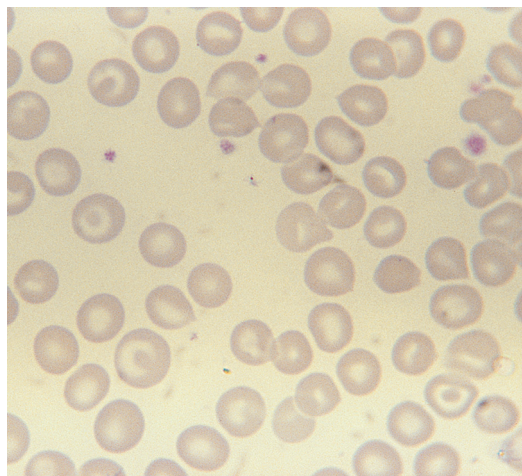


FIGURA 8.23 Distensão sanguínea de paciente com traço da hemoglobinopatia C mostrando vários eritrócitos em alvo e uma célula irregularmente contraída.

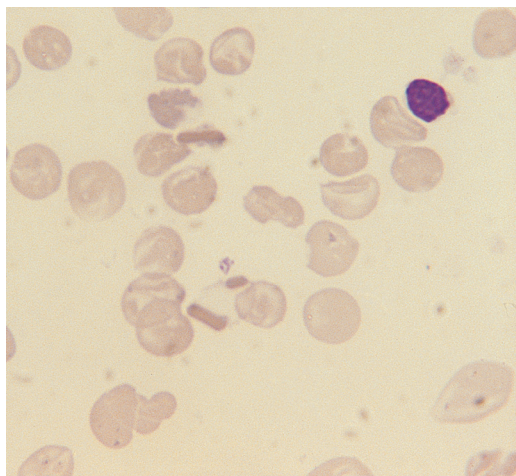


FIGURA 8.24 Distensão sanguínea de paciente com heterozigose composta para hemoglobina C/ β^0 -talassemia mostrando cristais de hemoglobina C dentro de células que parecem desprovidas de hemoglobina.

variando de raros a frequentes, e ocasionais células irregularmente contraídas. Costuma haver hipocromia e microcitose, mesmo na ausência de traço α -talassêmico coexistente [76]. A contagem de reticulócitos é normal. As contagens sanguíneas são normais ou mostram redução de VCM e HCM.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as demais causas da formação de eritrócitos em alvo (ver Tabela 3.7) e, às vezes, com as outras causas do aparecimento de eritrócitos irregularmente contraídos (ver Tabela 3.4).

Exames adicionais

Já que o hemograma pode ser inexpressivo, são necessários HPLC ou eletroforese da hemoglobina para confirmar ou excluir o traço da hemoglobinopatia C; um desses testes é indispensável quando houver necessidade de aconselhamento genético em populações da África Ocidental, em afro-caribenhos ou em afro-americanos, mesmo quando o teste de solubilidade negativo excluir a presença de hemoglobina S.

Hemoglobina C/ β -talassemia

Nos estados heterozigóticos compostos para hemoglobina C e β^0 ou β^+ -talassemia, costuma haver anemia sintomática e esplenomegalia.

Hemograma

A anemia é moderada. A distensão sanguínea (Figura 8.24) mostra microcitose, hipocromia, eritrócitos

em alvo e eritrócitos irregularmente contraídos. Podem estar presentes cristais de hemoglobina C. As contagens sanguíneas mostram redução de E, Hb, Hct, VCM e HCM.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a hemoglobinopatia C e com várias condições talassêmicas.

Exames adicionais

O diagnóstico depende de HPLC ou eletroforese da hemoglobina, complementados, se necessário, por exame dos familiares ou de genética molecular, para distinguir hemoglobinopatia C de hemoglobina C/ β^0 -talassemia.

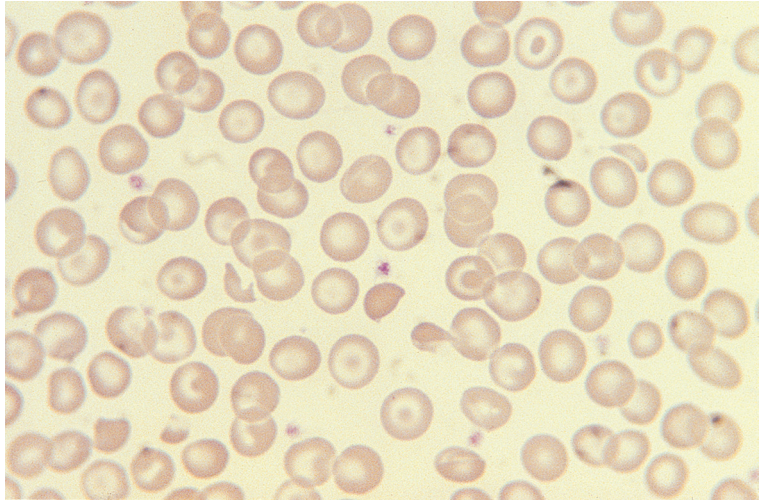
Hemoglobinopatia E

A hemoglobina E é uma variante de cadeia β muito comum na Tailândia, em Mianmar, em Laos, no Camboja, no Vietnã e na Malásia e, em menor grau, em outros países do Sudeste Asiático, da Indonésia ao Nepal, incluindo Sri Lanka. A frequência é muito baixa em indivíduos brancos norte-europeus e em indivíduos de etnia africana, mas foram observados casos eventuais em afro-caribenhos. A hemoglobinopatia E, genótipo β^E/β^E , é geralmente assintomática [77].

Hemograma

Há leve anemia ou hemoglobina normal. A distensão sanguínea (Figura 8.25) mostra hipocromia e microcitose, número variável de eritrócitos

FIGURA 8.25 Distensão sanguínea de paciente (homozigoto) com hemoglobinopatia E, mostrando hipocromia, microcitose, eritrócitos em alvo, algumas células irregularmente contraídas e outros pecilócitos. As contagens sanguíneas (Coulter S) foram: E $6,84 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 11,9 g/dL, Hct 37%, VCM 54 fL, HCM 17,4 pg, CHCM 26,7 g/dL.



em alvo e, às vezes, eritrócitos irregularmente contraídos. A contagem de reticulócitos costuma ser normal. O eritrograma é semelhante ao do traço da β -talassemia, com leve anemia ou Hb normal, alta contagem de eritrócitos e VCM e HCM reduzidos.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a heterozigose composta para hemoglobina E/ β -talassemia, traço β -talassêmico e deficiência de ferro. A hemoglobinopatia C também seria incluída no diagnóstico diferencial, não fosse o fato de quase não haver sobreposição entre os grupos étnicos nos quais ocorrem essas duas hemoglobinopatias. Na heterozigose dupla, hemoglobina E/ β^0 -talassemia, costuma haver anemia e microcitose mais intensas do que na hemoglobinopatia E, além de maior número de eritroblastos. A hemoglobina E/ β^+ -talassemia e as demais condições incorporadas no diagnóstico diferencial são excluídas por HPLC ou eletroforese da hemoglobina.

Exames adicionais

O diagnóstico requer HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram predominância de hemoglobina E, com no máximo 5-10% de hemoglobina F. A hemoglobina E tem a mesma mobilidade da hemoglobina C em pH alcalino e a mesma mobilidade da hemoglobina A em pH ácido. A HPLC distingue-as com facilidade, mas não a distingue da hemoglobina A_2 que tem o mesmo tempo de retenção. Em eletroforese capilar, as hemoglobinas e A_2 separam-se.

Traço da hemoglobinopatia E

O traço da hemoglobinopatia E, genótipo $\beta\beta^E$, é uma condição completamente assintomática, importante apenas por seu significado genético potencial.

Hemograma

A distensão sanguínea (Figura 8.26) pode ser normal, mostrar microcitose ou alguns eritrócitos em alvo ou irregularmente contraídos. Em uma minoria de pacientes, o eritrograma é normal; em 80 a 90%, há pequena redução do VCM e da HCM, com Hb em geral ainda nos limites de referência.

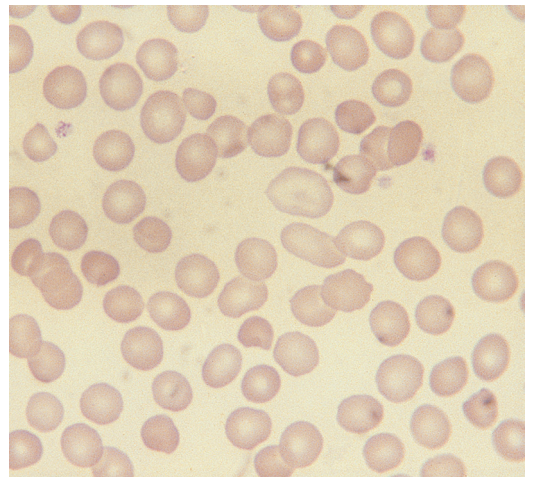


FIGURA 8.26 Distensão sanguínea de paciente com o traço da hemoglobina E mostrando hipocromia, microcitose e algumas células irregularmente contraídas. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: E $4,39 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 11 g/dL, Hct 32%, VCM 74 fL, HCM 25,1 pg, CHCM 33,2 g/dL.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a deficiência leve de ferro e com o traço β -talassêmico.

Exames adicionais

O diagnóstico depende de HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que mostram hemoglobina E e hemoglobina A; a hemoglobina E, devido à sua reduzida velocidade de síntese, constitui apenas um quarto da hemoglobina total. Em HPLC e eletroforese em acetato de celulose, as hemoglobinas E e A₂ não se separam, mas em eletroforese capilar, que faz a separação, nota-se aumento da hemoglobina A₂.

Hemoglobina E/ β -talassemia

A heterozigose composta hemoglobina E/ β -talassemia, genótipo β^E/β^0 ou β^E/β^+ -talassemia, é, de modo geral, muito mais grave do que a hemoglobinopatia E; ocorre no Sudeste Asiático e na Índia e, seguindo a imigração, na Europa e na América do Norte. A gravidade varia de anemia leve até uma condição que lembra a talassemia intermédia ou a maior, com anemia, hepatomegalia e esplenomegalia e com frequente dependência transfusional.

Hemograma

A anemia é geralmente moderada, com Hb de 7 a 9 g/dL, mas que pode variar de 2 a 13 g/dL [78]. Hipocromia acentuada e microcitose são achados habituais (Figura 8.27). Em alguns casos, os eritrócitos mostram pontilhado basófilo, anisocitose e pecilocitose. Os pecilócitos podem incluir eritrócitos em alvo, queratócitos, eritrócitos em lágrima, fragmentos e eritrócitos irregularmente contraídos.

A porcentagem de reticulócitos está aumentada, e podem estar presentes alguns eritroblastos. Há baixa de E, Hb, Hct, VCM e HCM e, frequentemente, também da CHCM.

As complicações que podem afetar o aspecto hematológico são crises aplásticas, anemia megaloblástica e hiperesplenismo.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a hemoglobinopatia E e com várias condições talassêmicas.

Exames adicionais

O diagnóstico depende de HPLC ou eletroforese da hemoglobina, que poderá necessitar de complementação de exames dos familiares ou de genética molecular. Na hemoglobinopatia E/ β^0 -talassemia, estão presentes hemoglobina E e hemoglobina F; os níveis da hemoglobina F variam de menos de 10% até acima de 50%. Na hemoglobinopatia E/ β^+ -talassemia, também está presente a hemoglobina A, constituindo cerca de 30% da hemoglobina total.

Hemoglobinas instáveis

Heterozigose para uma hemoglobina instável provoca anemia hemolítica leve, moderada ou severa, dependendo da gravidade do defeito molecular. A hemólise pode ser crônica ou precipitada ou agravada por infecção ou exposição a drogas oxidantes. O baço às vezes está aumentado, e os pacientes podem eliminar urina escura (hemoglobinúria) após os episódios de hemólise. Algumas hemoglobinas instáveis têm alta afinidade ao oxigênio e podem causar poliglobulia; quando este é o efeito

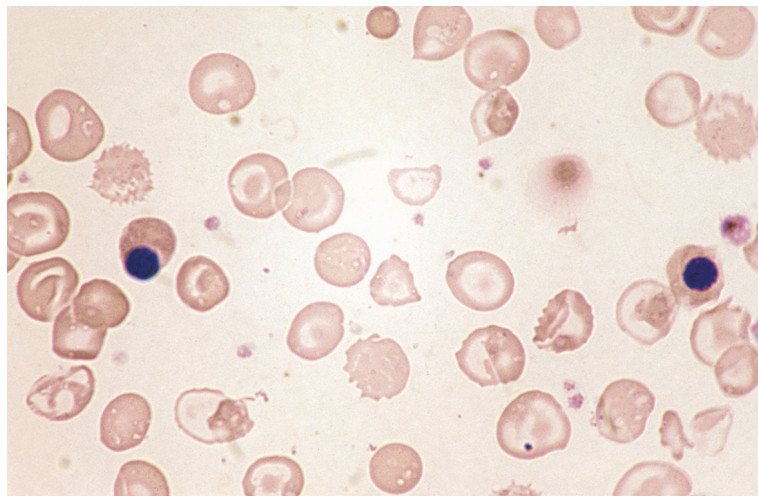


FIGURA 8.27 Distensão sanguínea de paciente com dupla heterozigose, hemoglobina E/ β -talassemia.

hematológico predominante, costuma falar-se em hemoglobina de alta afinidade, e não em hemoglobina instável.

Hemograma

A Hb varia de normal a acentuadamente reduzida nos casos com afinidade normal ao oxigênio, ao passo que os casos menos comuns, de hemoglobina instável com alta afinidade, podem apresentar Hb normal. Em alguns pacientes, a distensão sanguínea é normal ou mostra apenas macrocitose associada a uma alta contagem de reticulócitos (hemólise compensada). Em outros, há anisocitose, pecilocitose, hipocromia ou números variáveis de células irregularmente contraídas (Figura 8.28), “células mordidas” (*bite cells*), pontilhado basófilo e policromatofilia. Durante as crises hemolíticas, podem aparecer sinais de hipoesplenismo. Pacientes não esplenectomizados podem ter trombocitopenia, às vezes desproporcional ao grau de hiperesplenismo esperado.

O hemograma mostra diminuição de Hb, VCM e RDW aumentados e, em geral, HCM e CHCM diminuídas, estas em consequência da remoção de corpos de Heinz pelo baço. Em alguns casos, tem sido observada uma discrepância entre redução da HCM e da CHCM com ausência de hipocromia na distensão sanguínea, a qual tem sido atribuída ao fato de a hemoglobina instável poder perder alguns de seus grupos heme; a coloração dos eritrócitos deve-se ao conteúdo de globina, enquanto a dosagem bioquímica de hemoglobina depende da presença de heme [79]. A contagem de reticulócitos está aumentada, algumas vezes desproporcionalmente ao grau de anemia. Isso ocorre quando

a hemoglobina instável também tem afinidade aumentada ao oxigênio, o que agrava a hipoxia tecidual e estimula a eritropoese.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as demais causas do aparecimento de eritrócitos irregularmente contraídos e de anemia hemolítica.

Exames adicionais

Corpos de Heinz são detectados após esplenectomia e, durante crises hemolíticas, inclusive em pacientes não esplenectomizados. Um dos testes para hemoglobina instável, como o teste de instabilidade pelo calor ou pelo isopropanol, confirma o diagnóstico. Também deve ser feita HPLC ou eletroforese da hemoglobina. Na HPLC, a hemoglobina instável pode ter o mesmo tempo de retenção da hemoglobina A, mas pode haver um pequeno pico com tempo de retenção mais longo, representando a hemoglobina desnaturada. Na eletroforese em acetato de celulose, a mobilidade mostra-se normal, mas a banda de hemoglobina A pode ser borrada pela presença de alguma hemoglobina desnaturada.

Anemias macrocíticas

Anemias macrocíticas resultam de eritropoese anormal, que pode ser megaloblástica ou macronormoblástica. A eritropoiese megaloblástica caracteriza-se por diseritropoese, aumento de tamanho dos precursores eritroides e maturação nucleocitoplasmática assíncrona, com a maturação citoplasmática precedendo a maturação nuclear. A anemia macronormoblástica caracteriza-se pelo aumento de tamanho dos precursores eritroides, com ou sem

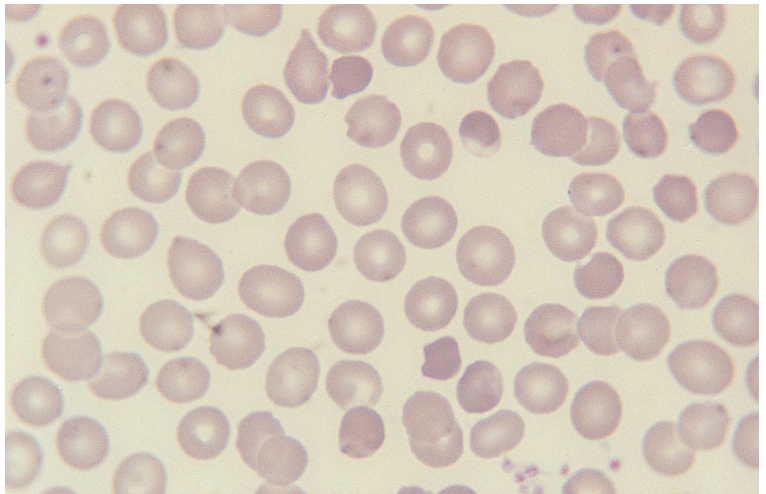


FIGURA 8.28 Distensão sanguínea de paciente heterozigoto para a hemoglobina Köln, mostrando algumas células irregularmente contraídas, incluindo uma na qual a hemoglobina está afastada da margem do eritrócito. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: $E 4,04 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 11,9 g/dL, Hct 40%, VCM 100 fL, HCM 29,5 pg, CHCM 29,4 g/dL.

outros aspectos diseritropoéticos. As causas mais comuns de anemia macrocítica são: ingestão excessiva de álcool, doença hepática, anemia megaloblástica e SMD.

Anemia megaloblástica

A anemia megaloblástica geralmente decorre de deficiência de vitamina B₁₂ ou de ácido fólico ou da administração de fármacos que interferem na síntese do DNA (ver Tabela 3.2). Algumas causas são particularmente importantes na infância [80] (Tabela 8.2). A causa mais frequente de deficiência de vitamina B₁₂ no adulto são anemia perniciosa e má absorção da vitamina B₁₂ alimentar [82]. As causas mais frequentes de deficiência de ácido fólico são dieta deficiente e má absorção, mas a primeira

TABELA 8.2 Algumas causas de anemia megaloblástica de particular importância em crianças pequenas

Natureza do defeito	Causas
Deficiência de vitamina B ₁₂	Deficiência materna de vitamina B ₁₂ (mãe vegana ou com anemia perniciosa não notada), particularmente em bebês sob aleitamento materno
	Falta ou defeito funcional de fator intrínseco (mutação <i>GIF</i>)
	Síndrome de Imerslund-Gräsbeck (mutação <i>CUBN</i> ou <i>AMN</i>)
	Falta ou defeito funcional de transcobalamina II (mutação <i>TCN2</i>)
	Ressecção do íleo por enterocolite necrosante
Erros congênitos do metabolismo de vitamina B ₁₂	Acidúria metilmalônica devida à deficiência combinada de adenosilcobalamina e metilcobalamina
Deficiência de folato	Deficiência de metionina sintase
	Prematuridade, particularmente com anemia hemolítica coexistente
	Bebês alimentados com leite de cabra
Erros congênitos do metabolismo de folato	Má absorção hereditária de folato (alguns casos pela mutação <i>SLC46A1</i>)
	Deficiência de glutamato formiminotransferase (mutação <i>FTCD</i>)
	Deficiência de metileno tetra-hidrofolato redutase (mutação <i>MTHFR</i>)
Outros erros congênitos do metabolismo	Anemia megaloblástica responsiva à tiamina
	Síndrome DIDMOAD (<i>D</i> iabetes <i>I</i> nsípido, <i>D</i> iabetes <i>M</i> elito, atrofia óptica [<i>Optic Atrophy</i>] – e surdez <i>D</i> eafness) (síndrome de Wolfram)
	Síndrome de Lesch-Nyhan (mutação <i>HPRT1</i>) [81]

está se tornando rara pela disseminação mundial do enriquecimento dos alimentos com ácido fólico. A ingestão excessiva de álcool poderá ser complicada pela deficiência dietética de ácido fólico, mas o álcool pode produzir macrocitose mesmo na ausência dessa deficiência; nesses casos, a eritropoese é macronormoblástica ou levemente megaloblástica. Eritropoese megaloblástica também pode ocorrer nas SMD e na eritroleucemia, mas eritropoese macronormoblástica é mais frequente nessas condições.

Os achados clínicos nos pacientes com falta de vitamina B₁₂ ou de ácido fólico são os habituais de anemia, mas também pode haver glossite, leve esplenomegalia e icterícia, esta como consequência da eritropoese ineficaz. Pacientes com falta de vitamina B₁₂ podem sofrer, ainda, de atrofia óptica, demência, neuropatia periférica e degeneração combinada das fibras sensitivas da medula espinal, causando paraparesia e diminuição da sensibilidade proprioceptiva; alguns pacientes são assintomáticos, com o diagnóstico sendo feito por acaso, ao examinar o sangue por outro motivo.

Hemograma

Os achados hematológicos das deficiências de vitamina B₁₂ e de folato são idênticos. À microscopia da distensão sanguínea (Figuras 8.29 e 8.30), a anemia caracteriza-se por macrocitose, anisocitose, pecilocitose (incluindo a presença de macrovalócitos e de eritrócitos em formato de lágrima) e hipersegmentação dos neutrófilos. A hipersegmentação não é invariavelmente presente, mas, na ausência, a cromatina mostra-se mais aberta do que o normal. Os macrócitos, além do diâmetro, têm espessura aumentada, por isso não mostram palidez central. Também podem estar presentes eosinófilos hipersegmentados, macropolícitos e pontilhado basófilo. À medida que a anemia se agrava, há aumento progressivo da anisocitose e da pecilocitose, com o aparecimento de micrócitos e fragmentos. Podem ser vistos micrócitos e fragmentos hipocrômicos, o que é um aspecto de diseritropoese, e não de deficiência de ferro coexistente. Pode surgir pequeno número de corpos de Howell-Jolly, de megaloblastos e de precursores granulocíticos na circulação. As contagens de leucócitos e plaquetas diminuem, com o desenvolvimento de moderada neutropenia e leve linfopenia. Geralmente não se nota policromatofilia, apesar da anemia severa, e a contagem de reticulócitos é baixa. Quando a anemia megaloblástica se desenvolve de forma aguda, pode haver insuficiência súbita da liberação de células pela medula óssea,

FIGURA 8.29 Distensão sanguínea de mulher idosa com má absorção de vitamina B₁₂ e deficiência dietética de ácido fólico mostrando anisocitose acentuada, macrocitose, alguns macrovalócitos, um pecilócito em formato de lágrima e um neutrófilo hipersegmentado. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: leucócitos $4,2 \times 10^3/\mu\text{L}$, E $0,76 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 3,6 g/dL, Hct 10%, VCM 133 fL, HCM 47,4 pg, CHCM 35,6 g/dL, contagem de plaquetas $50 \times 10^3/\mu\text{L}$.

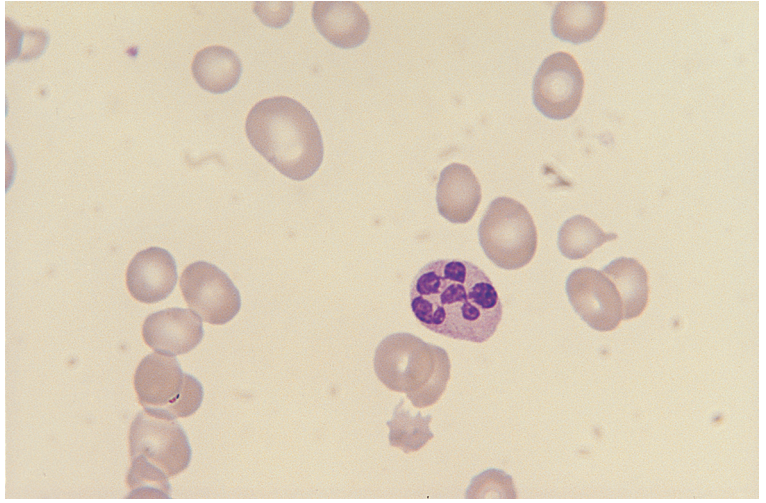
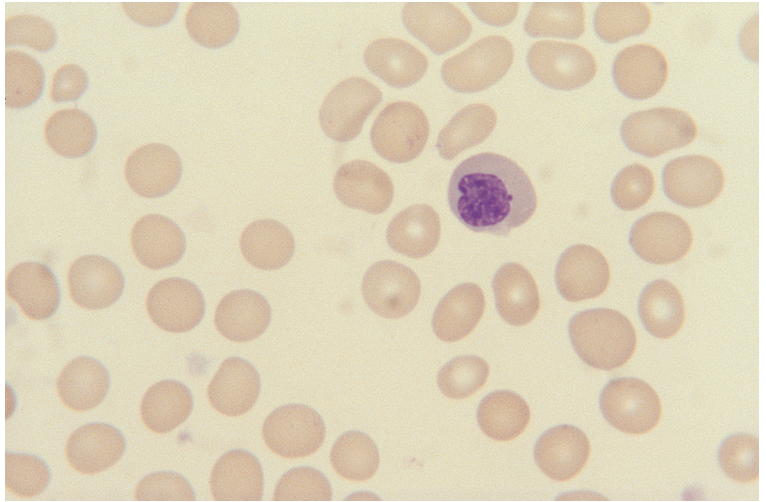


FIGURA 8.30 Distensão sanguínea de paciente com anemia perniciosa mostrando macrocitose e um megaloblasto circulante.



causando pancitopenia, com VCM normal, e ausência ou número pequeno de macrócitos e neutrófilos hipersegmentados; a policromatofilia está ausente e a contagem de reticulócitos é muito baixa. Essa “parada megaloblástica” é vista em pacientes agudamente enfermos, com frequência em associação com gravidez, cirurgia ou sepse. Raramente, em outros pacientes com anemia megaloblástica severa por deficiência de ácido fólico, o VCM mostra-se normal [83]. Em pacientes com achados hematológicos mínimos de deficiência de vitamina B₁₂ ou ácido fólico, como em alguns pacientes que se apresentam com as complicações neurológicas da deficiência de vitamina B₁₂, os achados hematológicos podem resumir-se a macrócitos ocasionais, ovais ou redondos, e alguns neutrófilos hipersegmentados. Às vezes, a macrocitose está associada a sinais

proeminentes de hipoesplenismo, particularmente à presença de corpúsculos de Pappenheimer e de corpos de Howell-Jolly grandes e numerosos (Figura 8.31); em pacientes não esplenectomizados, esses achados sugerem doença celíaca subjacente, com atrofia esplênica, como causa de deficiência de vitamina B₁₂ ou, mais frequentemente, de deficiência de folato.

A anemia megaloblástica resultante da administração de antagonistas do ácido fólico, como o metotrexato, é indistinguível da devida à deficiência de vitamina B₁₂ ou folato, mas quando a megaloblastose é causada por outros fármacos que interferem mais diretamente na síntese do DNA, há diferenças sutis. Quando são administrados durante muito tempo, pode haver considerável macrocitose, com ou sem anemia. Às vezes, há também

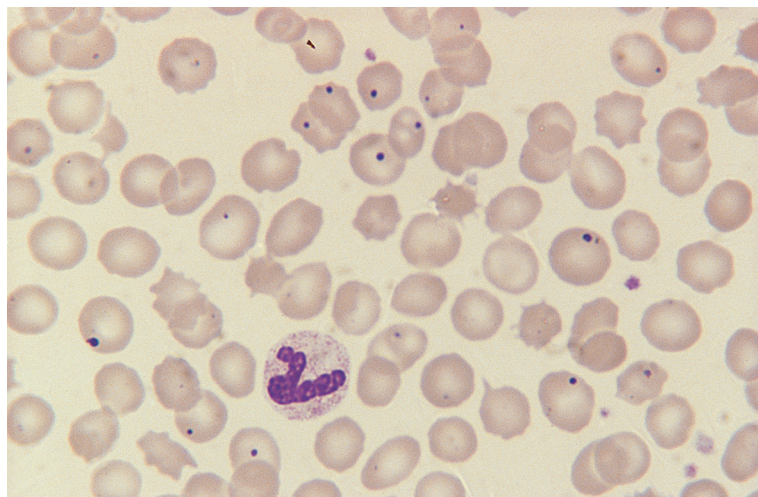


FIGURA 8.31 Distensão sanguínea de paciente esplenectomizado, submetido a transplante renal, com anemia megaloblástica causada pelo tratamento com a azatioprina, mostrando macrocitose, acantócitos e corpos de Howell-Jolly proeminentes.

estomatocitose. Neutrófilos hipersegmentados são bem menos comuns do que nos estados carenciais.

Quando coexistem deficiência de ferro e deficiência de vitamina B₁₂ ou de ácido fólico, as características da distensão sanguínea são variáveis. Além dos macrócitos, podem estar presentes micrócitos hipocrômicos ou podem predominar os aspectos característicos da deficiência de ferro, sendo a deficiência dupla sugerida apenas pela presença de neutrófilos hipersegmentados; note-se que estes podem ser vistos mesmo na deficiência de ferro não complicada ou ter outras causas (ver Capítulo 3). Às vezes, a deficiência de ferro é desmascarada quando o paciente com anemia megaloblástica e reservas inadequadas de ferro é tratado com

vitamina B₁₂ ou ácido fólico. Após elevação inicial da Hb e produção de células adequadamente hemoglobinizadas, esgotam-se os estoques de ferro, são produzidos micrócitos hipocrômicos e a distensão sanguínea torna-se dimórfica (Figura 8.32). Da mesma forma que a deficiência de ferro, o traço talassêmico pode inibir o desenvolvimento de macrocitose na anemia megaloblástica. O VCM pode subir para o intervalo de referência, em vez de acima deste.

Quando um paciente com anemia megaloblástica inicia o tratamento com a vitamina apropriada, passam-se 3 a 4 dias sem modificação hematológica aparente, após os quais o hemograma passa a mostrar rápido aumento das contagens de leucócitos e plaquetas, seguido pela aparição de macrócitos

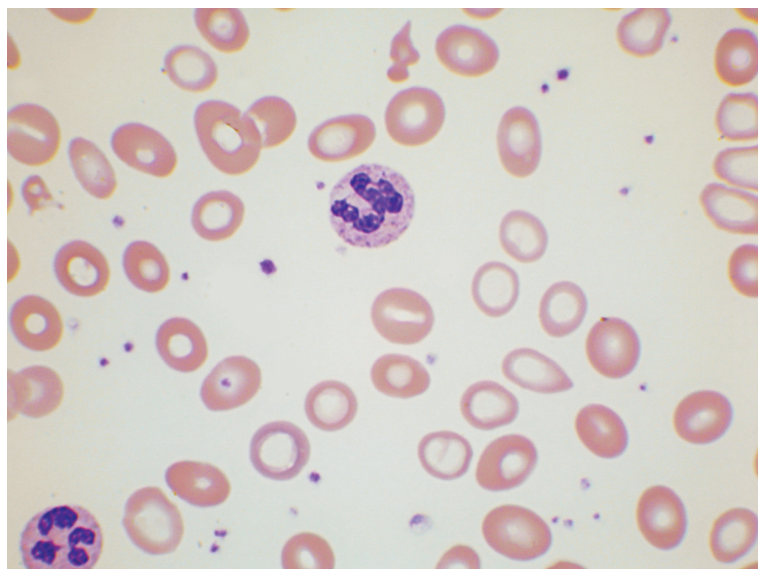


FIGURA 8.32 Um aspecto dimórfico da distensão sanguínea durante tratamento de anemia megaloblástica. As reservas de ferro foram exauridas com a regeneração e surgiu uma população de micrócitos hipocrômicos além da população original de macrócitos bem-hemoglobinizados. Cortesia do Dr. James Uprichard, Londres.

policromáticos e de rápido aumento da Hb. Se o paciente esteve pancitopênico, pode apresentar trombocitose de rebote, frequentemente associada a desvio à esquerda ou até a aspecto leucoeritroblástico. Neutrófilos hipersegmentados persistem no sangue durante 5 a 7 dias ou mais; em pacientes previamente citopênicos, podem até aumentar por alguns dias.

Na anemia megaloblástica, o eritrograma do instrumento eletrônico mostra baixa de E, Hb e Hct. Há aumento paralelo do VCM e da HCM. A CHCM é normal e o RDW, aumentado. O aumento do RDW antecede o do VCM. À medida que a anemia se agrava, a aparição de severa pecilocitose, acompanhada de fragmentação eritrocitária, pode levar a uma diminuição paradoxal do VCM;

o RDW torna-se, então, muito elevado. Nos instrumentos atuais da série Siemens H.1 e Advia, a anemia megaloblástica associa-se ao aumento do HDW, ao aumento do índice médio de peroxidase (MPXI) (indicando aumento da atividade média de peroxidase dos neutrófilos) e a redução do índice de lobularidade (indicando uma estrutura imatura de cromatina nuclear) [84] (Figura 8.33). O citograma eritrocítico mostra aumento de macrócitos normocrômicos e, quando a anemia é severa, também um aumento de micrócitos (Figura 8.34). Em contadores de impedância, o volume plaquetário médio (VPM) permanece relativamente baixo quando a trombocitopenia é causada por anemia megaloblástica e aumenta quando a trombocitopenia resulta de redução da sobrevida plaquetária [85].

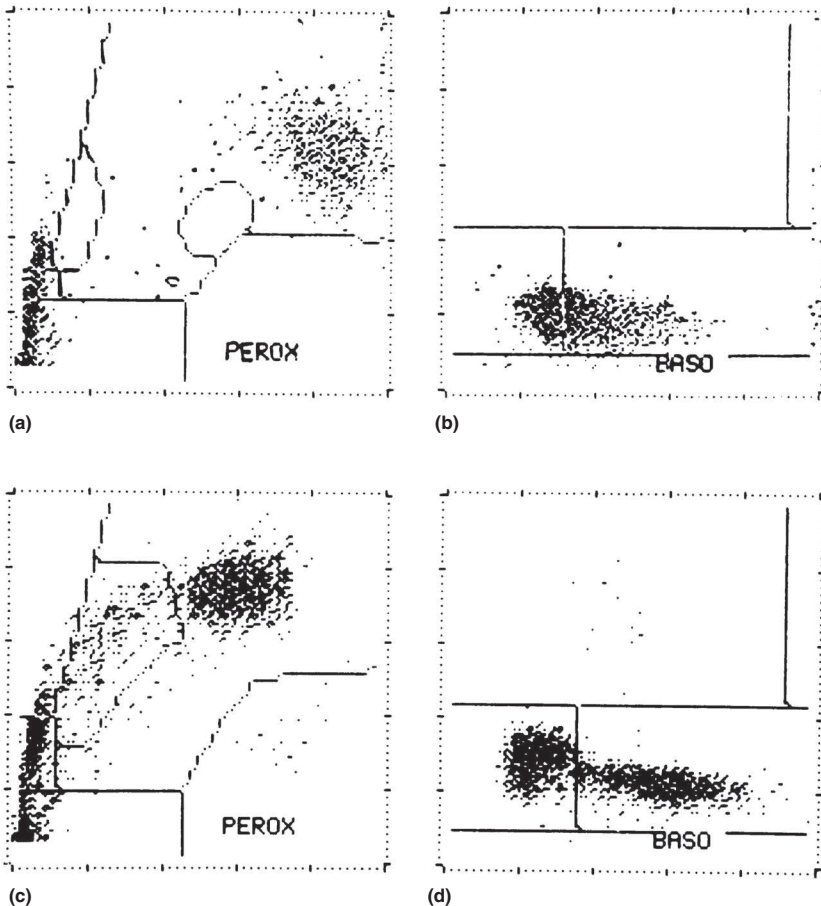


FIGURA 8.33 Scatter plots do canal da peroxidase (PEROX) e dos canais de lobularidade dos basófilos (BASO) em paciente com anemia megaloblástica (a, b) e em indivíduo normal (c, d), fornecidos pelo Bayer H.1. No canal da peroxidase, o conglomerado de neutrófilos é deslocado para a direita, indicando atividade de peroxidase elevada, a qual se reflete em um MPXI elevado. No canal de lobularidade dos basófilos, a estrutura anormal da cromatina dos neutrófilos levou à perda da depressão normal entre o conglomerado mononuclear (à esquerda) e o conglomerado granulocítico (à direita), refletindo-se em baixo “índice de lobularidade”.

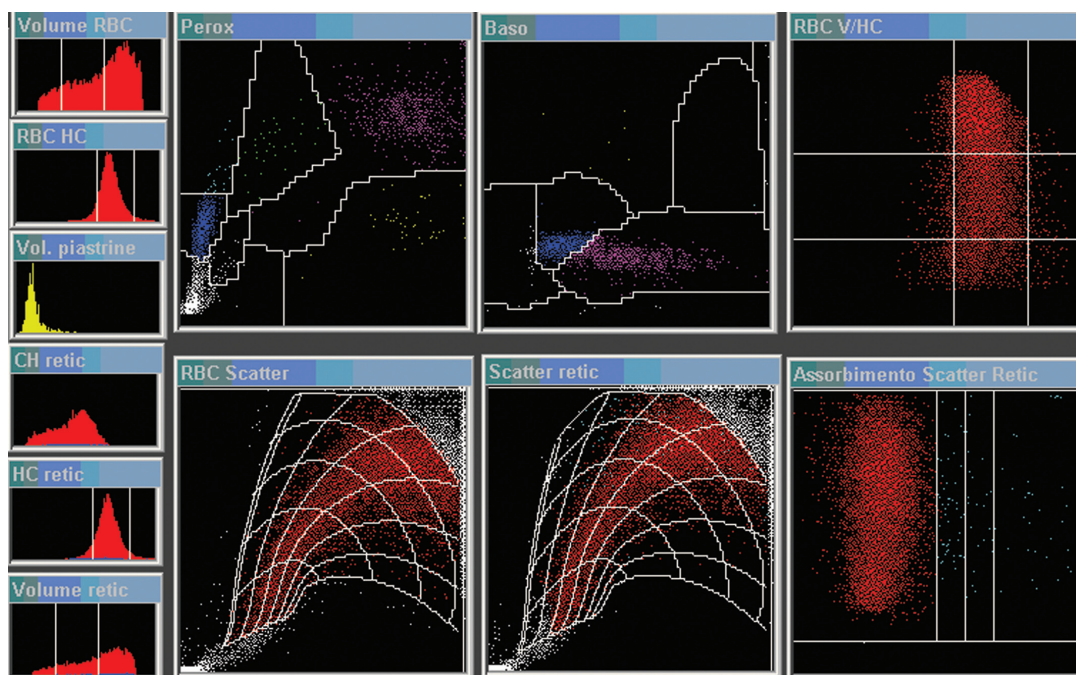


FIGURA 8.34 Scatter plots e histogramas do Siemens Advia em anemia megaloblástica grave. As contagens eram: leucócitos $2,1 \times 10^3/\mu\text{L}$, E $0,86 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 3,6 g/dL, Hct 10%, VCM 118 fL, HCM 41,6 pg, CHCM 35,3 g/dL, RDW 32,5%, HDW 0,37 g/dL (aumentado), plaquetas $106 \times 10^3/\mu\text{L}$. O citograma eritrocítico (RBC V/HC, no topo à direita) e o histograma (Volume RBC, no topo à esquerda) mostram grande aumento de macrócitos e aumento menor de micrócitos. RDW e HDW muito altos e aumento de micrócitos resultam da diseritropoese. Contagem de reticulócitos $13 \times 10^3/\mu\text{L}$, muito baixa, consistente com o baixo número de macrócitos hipocrômicos presentes. Cortesia da Professora Gina Zini.

Os vários métodos usados para avaliar hipersegmentação dos neutrófilos são discutidos no Capítulo 3. Em estudo comparando pacientes com deficiência de vitamina B₁₂ ou folato, que apresentavam eritropoese megaloblástica, com pacientes sem carência vitamínica, o índice proposto por Edwin foi o indicador mais sensível de megaloblastose [84]. O segundo mais sensível foi a porcentagem de neutrófilos com no mínimo cinco lóbulos. Em terceiro lugar, ficaram, igualmente, a contagem lobular média (escore de Arneth), a presença de neutrófilos com no mínimo seis lóbulos e um MPXI elevado no contador Siemens H.1.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita com as demais causas de macrocitose (ver Tabela 3.2) e, em casos graves e de rápida instalação, outras causas de insuficiência da medula óssea. Verificou-se que o RDW [8] e o MPXI aumentados [86] são, até certo ponto, úteis para diferenciar a anemia megaloblástica das outras

causas de macrocitose, nas quais esses parâmetros são menos frequentemente anormais. As características da distensão sanguínea também são úteis: na macrocitose devida a hepatopatia e a abuso crônico de álcool, os macrócitos são redondos em vez de ovais, não há neutrófilos hipersegmentados e podem estar presentes outras anormalidades (ver a seguir). Na macrocitose causada pelas SMD, podem ser vistos neutrófilos displásicos (hipogranulares ou hipolobulados) ou uma população de micrócitos hipocrômicos, resultante de eritropoese sideroblástica; em uma minoria, há trombocitose. Na anemia hemolítica crônica, a macrocitose pode ser acentuada, mas a policromatocitose é geralmente chamativa. As características da distensão sanguínea são muito importantes na identificação das anemias diseritropoéticas congênitas como causa de macrocitose (ver a seguir). Em pacientes com severa anemia megaloblástica com fragmentação eritrocítica chamativa e trombocitopenia, há possibilidade de diagnosticar erroneamente púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) [82].

Exames adicionais

Na anemia megaloblástica severa, os achados do sangue periférico são tão característicos que o diagnóstico é óbvio apenas pelo hemograma. O exame de material aspirado da medula óssea (mielograma) é confirmatório, mas geralmente desnecessário. Os exames úteis para estabelecer a distinção entre deficiência de vitamina B₁₂ e deficiência de ácido fólico são as dosagens de vitamina B₁₂ sérica e de folato eritrocitário. A vitamina B₁₂ sérica está diminuída em 97% dos pacientes com evidências clínicas de deficiência [87]. A vitamina B₁₂ sérica costuma ser normal em crianças com deficiência devida à rara deficiência de transcobalamina. Note-se que alguns métodos de dosagem fornecem resultados inválidos de vitamina B₁₂ sérica quando há anticorpos ao fator intrínseco, o que pode ocultar uma carência presente. A dosagem de holotranscobalamina sérica (i.e. é, cobalamina ligada à transcobalamina – antes designada transcobalamina II) pode detectar mais alguns pacientes com deficiência, mas com vitamina B₁₂ sérica total normal; note-se que o método ainda não está incluído na rotina laboratorial. A dosagem sérica de folato é um indicador mais seguro de balanço negativo de folato, mas a dosagem de folato eritrocitário é mais específica para a deficiência significativa de folato tecidual. O aumento da homocisteína plasmática é um indicador sensível da deficiência de vitamina B₁₂ [64] (sensibilidade de 96%) [87], mas níveis aumentados também são encontrados na deficiência de ácido fólico, no abuso alcoólico e na insuficiência renal; a necessidade de processamento rápido das amostras de sangue para a dosagem limita a utilidade clínica. A dosagem de ácido metilmalônico sérico é ao menos tão sensível como a dosagem de homocisteína (sensibilidade de 98%) [88] e é mais específica para a deficiência de vitamina B₁₂, mas o ácido metilmalônico também aumenta na insuficiência renal; a dosagem, entretanto, é difícil e nem sempre acessível. O teste de Schilling, medindo a excreção de B₁₂ com e sem fator intrínseco após administração oral de vitamina B₁₂ com marcador radiativo, foi muito usado e de grande valor diagnóstico, identificando má absorção de B₁₂ e distinguindo causa gástrica de causa intestinal; lamentavelmente, os reagentes não estão mais disponíveis.

Testes para anticorpos antifator intrínseco são úteis para confirmar o diagnóstico de anemia perniciosa, causa mais comum de deficiência de vitamina B₁₂, e, quando positivos, substituem o teste

de Schilling. São detectados em dois terços dos pacientes. Deve-se notar que uma alta concentração sérica de vitamina B₁₂ dá origem a resultados falso-positivos, de modo que a pesquisa nunca deve ser feita nas 24 horas que sucedem uma injeção de vitamina B₁₂ [89]. Na anemia perniciosa, em geral também estão presentes anticorpos para células parietais, mas estes são menos específicos do que anticorpos para o fator intrínseco. Como testes para má absorção de vitamina B₁₂ não são obtidos com facilidade, este é em geral um diagnóstico de exclusão. Aumento de gastrina sérica é útil no diagnóstico de anemia perniciosa; ela está elevada em cerca de 90% dos pacientes; está também elevada, entretanto, em um terço dos pacientes com má absorção de B₁₂ alimentar [90]. Se a suspeita de falta de ácido fólico, mais raramente, de vitamina B₁₂, for doença celíaca, o teste sorológico mais útil é a pesquisa de anticorpos para transglutaminase tecidual; como geralmente são pesquisados anticorpos IgA, em pacientes com deficiência coexistente de IgA (o que é comum em casos de doença celíaca), o teste será obviamente negativo. Pelo exposto, no caso de teste negativo, torna-se imperativa a exclusão de deficiência de IgA; se o paciente tiver deficiência de IgA, testar para anticorpos IgG. O teste definitivo para doença celíaca é a biópsia de intestino delgado.

Na anemia megaloblástica responsiva à tiamina (Figura 8.35) e na síndrome de Wolfram (DIDMOAD), o mielograma mostra tanto eritropoese sideroblástica como megaloblástica.

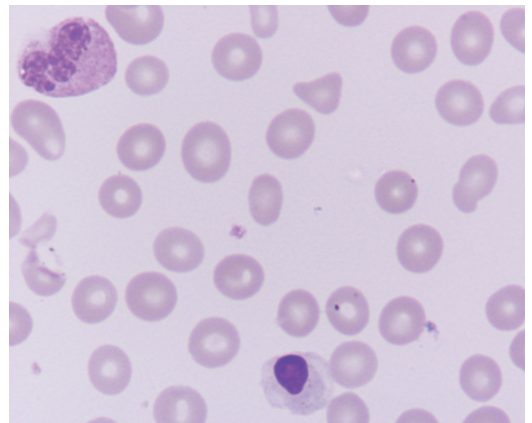


FIGURA 8.35 Distensão sanguínea de anemia hemolítica responsiva à tiamina, mostrando macrocitose, pecilocitose leve e um eritroblasto megalóide circulante. Cortesia do Dr. Abbas Hashim Abdulsalam, Bagdá.

Anemia macrocítica associada à ingestão excessiva de álcool e à hepatopatia

Ingestão excessiva de álcool e hepatopatia crônica podem causar anemia macrocítica. As duas causas frequentemente coexistem. Leucopenia e trombocitopenia concomitantes são comuns, causadas pelo efeito do álcool sobre a medula óssea ou pelo hipersplenismo associado à hepatopatia crônica. Os pacientes podem apresentar equimoses ou sintomas de anemia, mas geralmente os efeitos do excesso alcoólico ou da doença hepática são mais evidentes do que os da doença sanguínea.

Hemograma

A distensão sanguínea mostra macrocitose com macrócitos predominantemente redondos, em vez de ovais como na anemia megaloblástica. Anisocitose e pecilocitose são moderadas; são comuns eritrócitos em alvo e estomatócitos. Pode haver leucopenia e trombocitopenia, mas não são vistos neutrófilos hipersegmentados. Na hepatopatia crônica, a formação de *rouleaux* está aumentada, devido ao aumento das imunoglobulinas. Os pacientes com hepatopatia alcoólica aguda podem apresentar, ainda, anemia hemolítica com eritrócitos irregularmente contraídos e hiperlipidemia associada (síndrome de Zieve). Pacientes com insuficiência hepática avançada, por qualquer causa, podem apresentar “anemia hemolítica com células em espora” (*spur-cell anemia*), caracterizada por acantocitose.

Há diminuição de E, Hb e Hct. O VCM e a HCM estão aumentados. A CHCM é normal e o RDW é frequentemente normal.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a anemia megaloblástica, em especial a causada pela deficiência dietética de folato em alcoolistas de classes sociais menos favorecidas (“*Skid Row*” *alcoholics*).

Exames adicionais

O folato eritrocitário é normal ou baixo. A vitamina B₁₂ está aumentada, em consequência da liberação de transcobalamina II pelo fígado lesado. O tempo de protrombina e os testes de função hepática, incluindo a gamaglutamil transpeptidase, são úteis. O teste de supressão da medula óssea com desoxiuridina, quando normal, é útil para excluir a deficiência significativa de vitamina B₁₂ ou de ácido fólico em alcoolistas com macrocitose, mas o teste não está disponível na rotina.

Anemia macrocítica em síndromes mielodisplásicas

Anemia macrocítica é comum em síndromes mielodisplásicas (SMDs), discutidas em detalhes no Capítulo 9.

Hemograma

A distensão sanguínea mostra macrócitos, com anisocitose e pecilocitose. Em pacientes com anemia sideroblástica, o aspecto é dimórfico, com micrócitos hipocrômicos além dos macrócitos bem-hemoglobinizados. Pode haver neutropenia e trombocitopenia e aspectos displásicos em todas as linhagens.

Hb, Hct e E estão diminuídos; VCM, HCM e RDW, aumentados. Os citogramas RBC V/HC na série Siemens Advia (volume corpuscular na ordenada, concentração hemoglobínica na abscissa) mostram um padrão preditivo da presença de sideroblastos em anel (Figura 8.36). Os sinais dispersam-se em oito das nove áreas do citograma (faltando apenas macrócitos hiperocrômicos) e com aumento característico de eritrócitos microcíticos (abaixo do limiar horizontal inferior, que marca volume corpuscular < 60 fL) e eritrócitos hipocrômicos (à esquerda do limiar vertical da esquerda, que marca concentração hemoglobínica < 28 g/dL); o formato do *scatter plot* difere do formato da anemia ferropênica e do traço talassêmico [91]. O padrão é razoavelmente sensível na detecção de eritropoese sideroblástica (32 de 38 casos) e é preditivo (20 de 21 casos) [91]. Pacientes com eritropoese sideroblástica têm conteúdo hemoglobínico dos reticulócitos (CHr) normal em contrapartida ao nível baixo visto na anemia ferropênica [91].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras anemias macrocíticas. Note-se que há uma “macrocitose idiopática” (displasia macrocítica de significação obscura), por definição de causa desconhecida, mas que se suspeita ser um prelúdio a SMD [92].

Outros testes

A investigação na suspeita de SMD exige aspiração da medula óssea com exame citológico (mielograma) e análise citogenética (ver Capítulo 9).

Anemias hemolíticas congênicas

Anemias hemolíticas congênicas resultam de anormalidades hereditárias da membrana, da hemoglobina ou de enzimas eritrocitárias. As principais

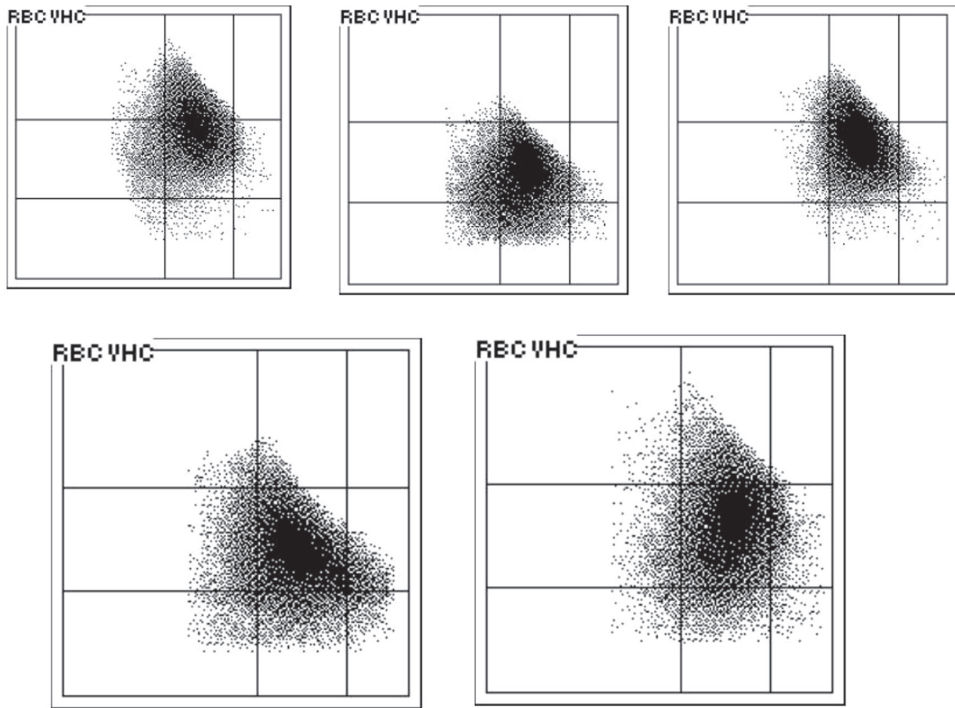


FIGURA 8.36 Citogramas *RBC VHC* (Siemens Advia) de cinco pacientes com anemia sideroblástica adquirida, mostrando o padrão característico, com aumento de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos e, também, em geral com aumento de macrócitos hipocrômicos e normocrômicos. Cortesia da Dr^a. Alicia Rovó, Basileia.

deficiências enzimáticas situam-se na via glicolítica, relacionada com as necessidades energéticas do eritrócito, e no *shunt* da pentose, que protege o eritrócito de dano oxidante. Anemias hemolíticas congênitas, com base genética, persistem durante toda a vida. Anemias hemolíticas congênitas podem, também, ser adquiridas *in utero*, como é o caso da doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade ABO ou Rh; nesse caso, são doenças passageiras. A hemólise associada a hemoglobinas anormais já foi discutida anteriormente neste capítulo; defeitos da membrana dos eritrócitos e anormalidades enzimáticas serão discutidos aqui. A estrutura normal da membrana, que é uma dupla camada lipídica suportada por um citoesqueleto, está ilustrada na Figura 8.37.

Esferocitose hereditária e variantes

Esferocitose hereditária

Sob a designação “esferocitose hereditária”, inclui-se na verdade um grupo heterogêneo de defeitos genéticos [93]. A esferocitose hereditária ocorre em vários grupos étnicos, incluindo brancos, norte-africanos, indianos e japoneses; é rara nas etnias

da África subsaariana. A prevalência em brancos norte-europeus é, ao menos, de 1 a 2.000 [94]. Cerca de três quartos dos casos mostram herança autossômica dominante; os restantes correspondem a novas mutações esporádicas (a maioria) ou com herança autossômica recessiva (a minoria) [94, 95]. O defeito genético causal na forma autossômica dominante comum é uma mutação no gene da anquirina (*ANK1*) em cerca de 50% dos casos, no gene da β -espectrina (*SPTB*) em aproximadamente 30%, no gene da proteína da membrana banda 3 (*SLC4A1* ou *EPB3*) em 15 a 20% [68] e no gene da α -espectrina (*SPTA*) ou no gene da proteína 4.2 (paladina) (*EPB4.2*) em uma pequena minoria. O ritmo de síntese da α -espectrina é em geral três ou quatro vezes mais rápido do que o da β -espectrina, de modo que a esferocitose hereditária só está associada à homozigose ou à heterozigose composta para mutações *SPTA*, mas está associada à heterozigose para mutações *SPTB*. Mutações causais de esferocitose no gene da banda 3 produzem síntese reduzida de banda 3 ou síntese de uma proteína instável ou que se liga mal à proteína 4.2 ou à anquirina [96]. As formas recessivas mais raras

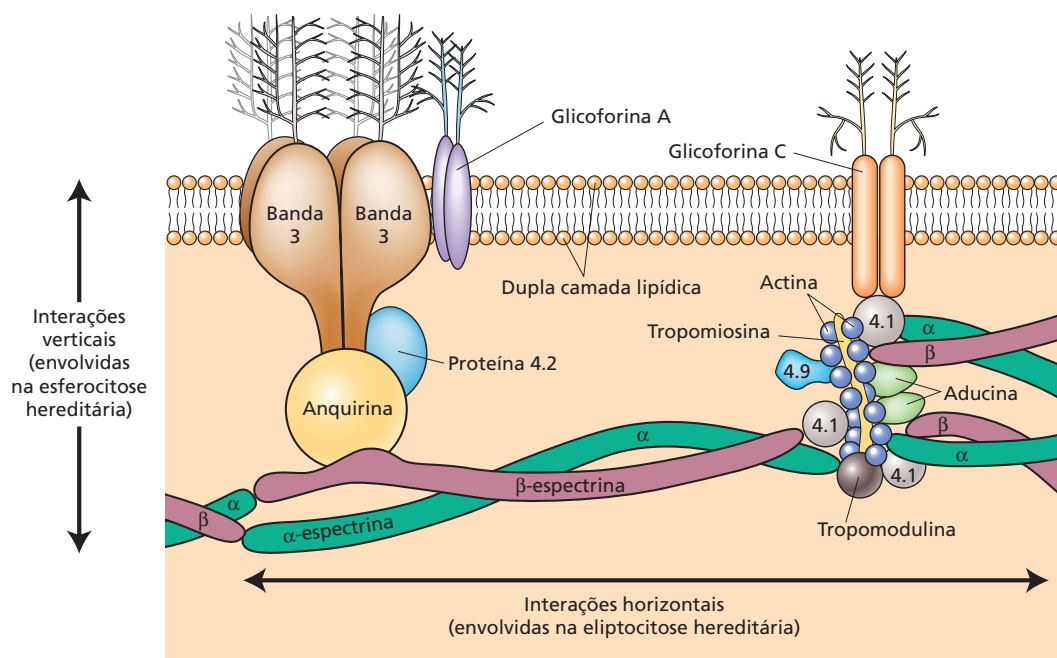


FIGURA 8.37 Diagrama ilustrando a estrutura da membrana do eritrócito.

de esferocitose hereditária associam-se particularmente a heterozigose composta ou homozigose para mutações da α -espectrina [97], mas também a mutações dos genes da banda 3 [96], da β -espectrina e da proteína 4.2 [98, 99]. Mutações de *EPB42* têm sido descritas principalmente em japoneses [98]. Raramente, mutações no gene *SLC4A1*, que resultam em ausência completa de banda 3, causam ao mesmo tempo acidose renal tubular distal e esferocitose hereditária, mas em outras famílias essa mutação causa uma ou outra dessas condições [93] ou acidose renal com anemia hemolítica acantocítica ou ovalocítica. Homozigose para essas mutações (p. ex., banda 3 Coimbra) pode causar acidose tubular renal com esferocitose hereditária grave e hidropisia fetal, e geralmente é incompatível com a vida [100]. O mecanismo gerador de esferocitose, na maioria dos casos de esferocitose hereditária, é a deficiência da espectrina, seja primária ou secundária a uma anormalidade de anquirina, levando à redução da densidade do citoesqueleto, à falta de ligação deste à banda 3 e à consequente instabilidade de áreas sem suporte da dupla camada lipídica. Ocorre, então, perda de vesículas de lipídeos da membrana desestabilizada, *in vitro* e provavelmente *in vivo*, levando à esferocitose. Uma redução da proteína banda 3 tem

efeito similar. Parece provável que na deficiência de proteína 4.2 haja defeito na ligação de espectrina, através da anquirina e da banda 3, à proteína da membrana CD47 [99]. Mutações associadas com esferocitose hereditária estão listadas em Human Gene Mutation Database [101] e em Online Mendelian Inheritance in Man [102].

A esferocitose hereditária pode ser assintomática e diagnosticada só acidentalmente ou pode haver anemia significativa e icterícia intermitente; esplenomegalia é comum. Devido à hemólise crônica, há produção aumentada de bilirrubina e maior incidência de litíase vesicular. Anemia sintomática pode surgir apenas quando há infecção bacteriana intercorrente, infecção por parvovírus B19 ou deficiência de ácido fólico. Em atletas, a hemólise pode aumentar, causando anemia sintomática, como decorrência de exercício vigoroso e repetido [103]. A esferocitose hereditária pode ser melhorada, pela herança concomitante de traço β -talassêmico [96].

Bebês com esferocitose hereditária costumam nascer com Hb normal. Icterícia neonatal é comum e pode requerer fototerapia, às vezes exsanguineotransfusão. Esses pacientes costumam apresentar anemia transitória, mas severa, em torno dos 20 dias de idade [104]. Pode ser necessária transfusão nessa eventualidade. Esplenomegalia é comum no primeiro ano de vida.

Hemograma

Dependendo da anormalidade genética específica, pode haver anemia hemolítica ou hemólise compensada. A distensão sanguínea (Figura 8.38) mostra número variável de esferócitos e esferoestomatócitos, de identificação mais difícil. Há também eritrócitos com palidez central normal. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que apenas uma minoria das células é esférica, a maioria sendo constituída de discócitos, estomatócitos ou esferoestomatócitos [105]. Em casos leves de esferocitose hereditária, pode ser muito difícil identificar com certeza a presença de esferócitos ao exame microscópico da distensão sanguínea, sendo necessários testes confirmatórios. Em casos severos, a esferocitose é óbvia, há policromatofilia

e macrócitos policromáticos e, às vezes, outros pevilócitos. A porcentagem e a contagem absoluta de reticulócitos estão elevadas. Após esplenectomia, são vistos os sinais pós-esplenectomia habituais, mas não eritrócitos em alvo; esferoacantócitos podem ser muito numerosos (Figura 8.39). Exames ultraestruturais mostram que a esplenectomia leva ao desaparecimento de uma pequena população de microesferócitos [105]. No período neonatal, o diagnóstico é difícil; um terço dos bebês não apresenta número significativo de esferócitos [106].

Certos aspectos morfológicos característicos estão associados a algumas mutações específicas [107-112]: a presença de esferócitos junto com acantócitos associa-se a uma β -espectrina mutante, com ligação defeituosa à proteína 4.1 e com outras

FIGURA 8.38 Distensão sanguínea de paciente com esferocitose hereditária, com hemólise crônica moderada, sem anemia, mas mostrando número moderado de esferócitos.

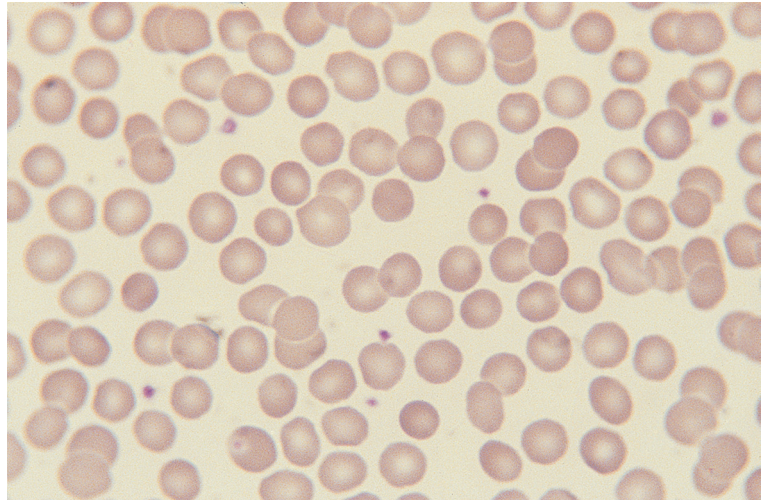
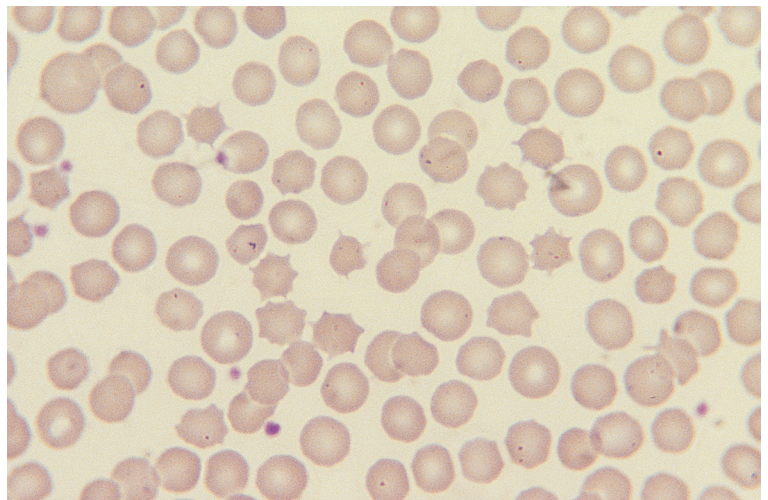


FIGURA 8.39 Distensão sanguínea de paciente com esferocitose hereditária (pai do paciente da Figura 8.38) que foi esplenectomizado, mostrando esferoacantócitos.



mutações *mis-sense* e nulas do gene da β -espectrina, inclusive uma em que há truncamento da molécula [109] e uma do códon inicial [111]; a deficiência de banda 3 está associada à presença de eritrócitos pinçados ou em formato de cogumelo, que desaparecem após a esplenectomia (ver Figura 3.59); a banda 4.2^{Nippon} e a banda 4.2^{Komatsu} estão associadas à presença de estomatócitos, ovalócitos e esfero-ovalócitos nos homozigotos [98]; a deficiência de proteína 4.2 está associada a ovaloesferócitos e eritrócitos pinçados [99]; a deficiência severa de espectrina e anquirina apresenta esferócitos irregulares, e alguns assemelham-se às células da piropecilocitose hereditária. A heterozigose para a banda 3^{Coimbra} causa esferocitose típica, ao passo que a rara homozigose associa-se à total ausência de banda 3 e à esferocitose hereditária muito severa, com acentuada pecilocitose, incluindo eritrócitos com projeções alongadas, como um caule [112].

O eritograma na esferocitose hereditária mostra Hb normal ou reduzida e VCM e HCM normais, embora o VCM possa ser considerado baixo se for levada em conta a baixa idade média dos eritrócitos pela sobrevida encurtada. Em contadores de impedância, a CHCM situa-se no limite de referência superior, ou um pouco acima. Em contadores da

série Siemens H.1 e Advia, a CHCM está aumentada na maioria dos pacientes, que também mostram aumento do RDW e do HDW e, nos histogramas, uma cauda de micrócitos e uma de eritrócitos hipercrômicos [113]. Os citogramas (Figuras 8.40 e 8.41) mostram aumento característico de eritrócitos hipercrômicos ou hiperdensos e, se houver macrocitose significativa, aumento de macrócitos hipocrômicos. Uma porcentagem aumentada de eritrócitos hiperdensos não é um achado específico da esferocitose, mas o exame da distensão sanguínea permite que os esferócitos sejam distinguidos dos demais tipos de eritrócitos hiperdensos, como eritrócitos falciformes e eritrócitos irregularmente contraídos. Após a esplenectomia, a Hb aumenta, em geral, até o nível normal, e o RDW e o HDW geralmente voltam à normalidade. Micrócitos tornam-se incomuns, mas persiste o número aumentado de eritrócitos hipercrômicos [113]. No contador Beckman-Coulter Gen S e LH 750, obtém-se um volume médio de células esferadas (MSCV) (ver Capítulo 2) bem mais baixo que o VCM, o que foi descrito como achado de alta sensibilidade e razoável especificidade para identificação de esferocitose [114, 115]; esses achados são gersalmente normais na anemia hemolítica autoimune [115].

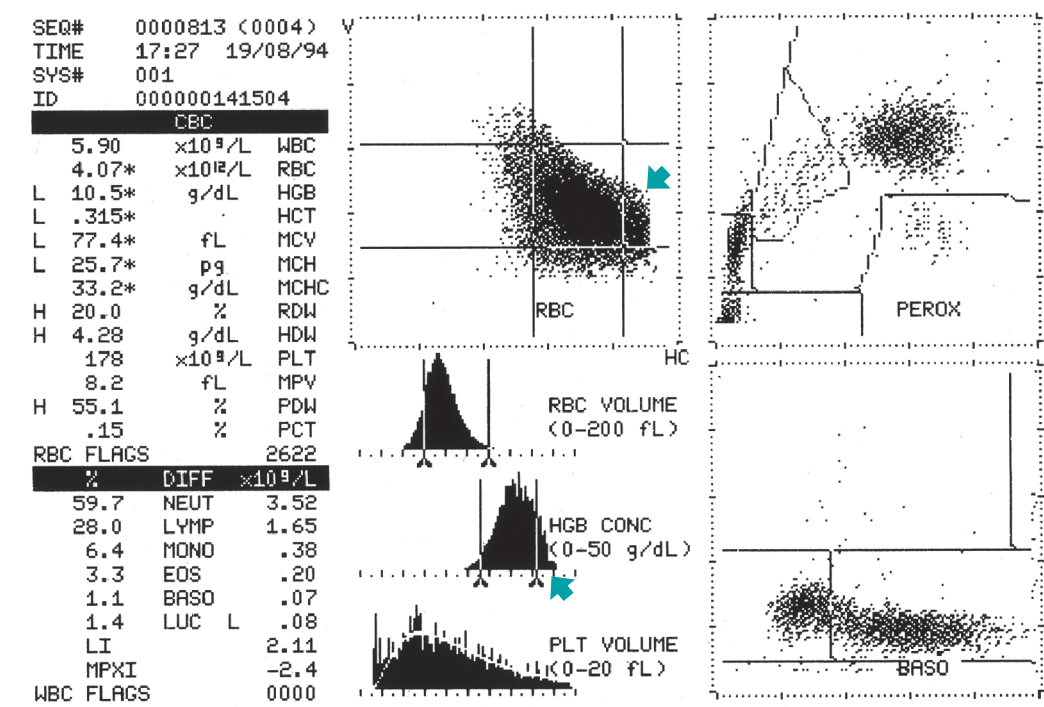


FIGURA 8.40 Scatter plots e histogramas (Bayer H.2) de um paciente com esferocitose hereditária. Tanto o citograma quanto o histograma da hemoglobina mostram grande número de células densas, que são os esferócitos (setas verdes).

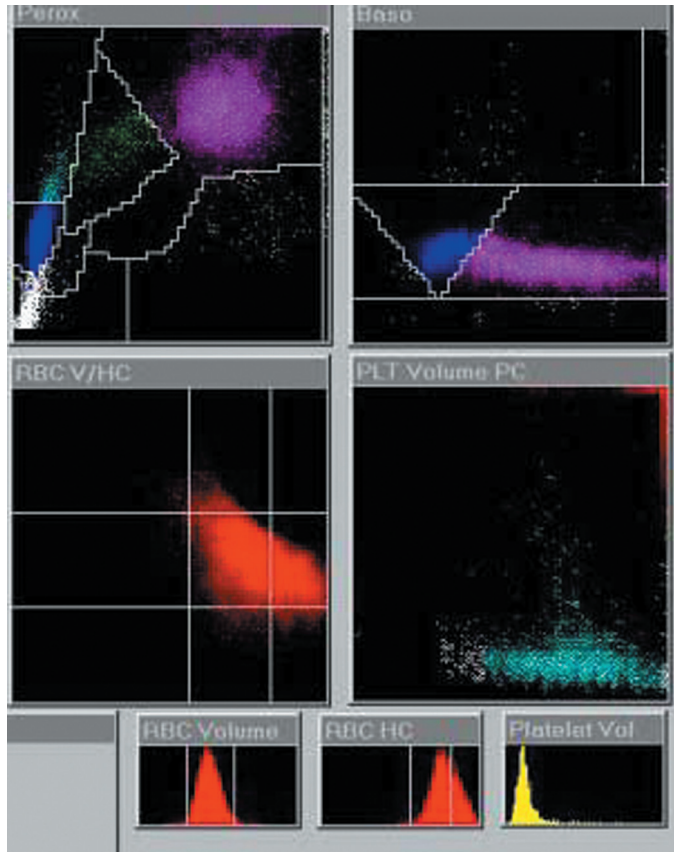


FIGURA 8.41 Scatter plots e histogramas do Bayer Advia 120 de um paciente com esferocitose hereditária. Cortesia da Sra. Sue Mead, Woodley.

Um agravamento súbito da anemia na esferocitose hereditária pode ser causado por (i) anemia megaloblástica resultante da deficiência de folato, (ii) desenvolvimento de “anemia de doença crônica” durante uma infecção aguda, ou (iii) aplasia eritroide induzida pela infecção por parvovírus B19 ou, mais raramente, por outro vírus, como o da *influenza* [116]. Devido à sobrevivência eritrocitária encurtada, a anemia desenvolve-se de maneira aguda. Na anemia megaloblástica, a policromatocitose diminui em comparação com o estado estável, e surgem macrócitos, macrovalócitos e neutrófilos hipersegmentados (Figura 8.42). Na ADC, associada, por exemplo, à infecção aguda ou crônica, a policromatocitose também diminui, e os eritrócitos tornam-se menos esferocíticos, alguns desenvolvendo palidez central; a distensão sanguínea pode mostrar um aspecto dimórfico (Figura 8.43). Se não se souber que o paciente tem esferocitose hereditária, pode ser difícil o diagnóstico nesse estágio. Na aplasia eritroide pura, os eritrócitos permanecem esferocíticos,

mas a policromatocitose desaparece, e a contagem de reticulócitos cai a quase zero; uma esferocitose hereditária não diagnosticada previamente pode ser desmascarada nessa eventualidade e, também, pela mononucleose infecciosa, que agrava a hemólise. O diagnóstico é mais difícil durante a recuperação da aplasia eritroide induzida por parvovírus, pois os eritrócitos jovens, recém-egressos da medula, não são esferocíticos. Episódios hemolíticos também podem ser induzidos por exercício ou precipitados por gravidez. A destruição eritrocitária aumentada nas anemias hemolíticas crônicas predispõe à formação de cálculos biliares; pacientes com esferocitose hereditária têm, por isso, uma probabilidade aumentada de desenvolver icterícia obstrutiva. Quando isso ocorre, a membrana eritrocitária absorve mais lipídio, e, consequentemente, a esferocitose e a hemólise diminuem. A deficiência de ferro também está associada à redução da esferocitose e, às vezes, à presença de uma distensão sanguínea de aspecto dimórfico.

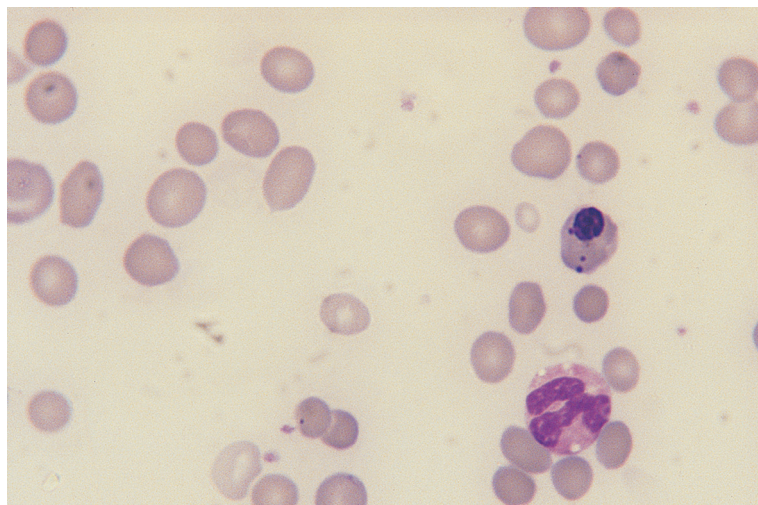


FIGURA 8.42 Distensão sanguínea de paciente com esferocitose hereditária que desenvolveu anemia megaloblástica devido à ingestão insuficiente de folato para as necessidades aumentadas pela hemólise crônica. A distensão mostra macrócitos, macrovalócitos, esferócitos ocasionais e um megaloblasto com corpos de Howell-Jolly.

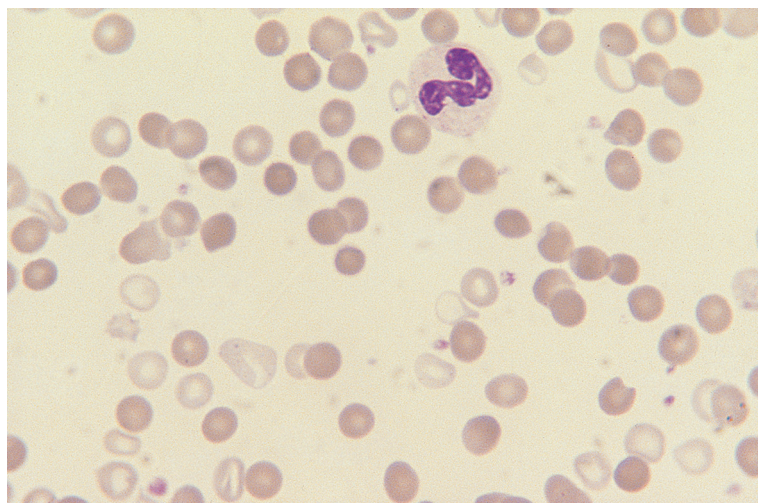


FIGURA 8.43 Distensão sanguínea de paciente com esferocitose hereditária (o mesmo paciente da Figura 8.41) durante um episódio de "anemia de doença crônica" associada à infecção intercorrente. Alguns eritrócitos têm palidez central e são hipocrômicos e microcíticos. Aspecto dimórfico.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita principalmente com a anemia hemolítica autoimune com anticorpos quentes (ver adiante). As distensões sanguíneas são com frequência indistinguíveis, sendo necessários um teste de antiglobulina direto (Coombs direto) e a história familiar. Para outras causas de esferocitose a considerar no diagnóstico diferencial, ver Tabela 3.3. Geralmente, o diagnóstico é evidente apenas com a história clínica, mas os achados laboratoriais podem ser úteis. Na anemia hemolítica compensada, leve, associada ao fenótipo Rh nulo (ver Tabela 8.4), há alguns estomatócitos, bem como esferócitos, além de falta de todos os antígenos Rh na membrana

eritrocitária. Na síndrome de Zieve, uma anemia hemolítica aguda associada a hepatopatia alcoólica, há eritrócitos irregularmente contraídos, bem como esferócitos. Na sepse por *Clostridium perfringens*, a membrana eritrocitária está tão danificada que são vistos numerosos estromas. Hemólise ulterior *in vitro* pode causar elevação artifactual da HCM e da CHCM.

No período neonatal, o diagnóstico diferencial inclui a doença hemolítica do recém-nascido, em especial a causada por incompatibilidade ABO (ver adiante). Deve-se observar que a incompatibilidade ABO clinicamente evidente é mais comum em bebês que, mais tarde, serão identificados como portadores de esferocitose hereditária.

Exames adicionais

O teste de antiglobulina direto é negativo. O diagnóstico tem sido tradicionalmente confirmado pelo teste de fragilidade osmótica; esse teste confirma a presença de células osmoticamente frágeis, mas não distingue esferocitose hereditária de anemia hemolítica autoimune ou de outras causas de esferocitose. Em casos leves, poderá ser necessário um teste de fragilidade osmótica feito após incubação dos eritrócitos a 37°C durante 24 horas, para demonstrar a presença de células anormais. Em casos muito leves, a fragilidade osmótica pode ser normal até mesmo após incubação. A fragilidade osmótica pode normalizar na presença concomitante de anemia ferropênica, de icterícia obstrutiva e de reticulocitose pós-aplasia. Após a esplenectomia, o teste de fragilidade osmótica permanece anormal, mas uma pequena população de eritrócitos muito frágeis pode desaparecer; essa população provavelmente representava eritrócitos muito alterados, resultantes de dano no baço. Quando se dispõe de um contador automatizado que detecta células hiperdensas (como a série Siemens-Advia), diminui muito a necessidade do teste de fragilidade osmótica; a detecção da discrepância MSCV/VCM (no Beckman-Coulter LH 750) pode ter a mesma utilidade. A citometria em fluxo, mostrando *uptake* de eosina-5-maleimida (EMA), que se liga à banda 3 da membrana, à proteína Rh, à glicoproteína Rh e ao CD47, todos reduzidos na esferocitose hereditária, também pode diminuir a necessidade do teste de fragilidade osmótica [116-118]; a maioria dos pacientes com esferocitose hereditária mostra uma redução da fluorescência média, enquanto na anemia hemolítica autoimune os resultados são normais ou aumentados; contrariando observações prévias, o teste é igualmente anormal quando a esferocitose se deve a deficiência de banda 3, de espectrina ou de anquirina [119]. Resultados anormais não são específicos para esferocitose; são encontrados também na piropecilocitose hereditária, na ovalocitose do Sudeste Asiático, na anemia diseritropoética congênita do tipo II, na crio-hidrocitose e em alguns pacientes com eliptocitose hereditária [116, 117] e em homozigotos para uma mutação *SLC4A1* que ocasiona anemia hemolítica com acantocitose [120]. A avaliação por citometria em fluxo da tomada de EMA, juntamente com o aspecto da distensão sanguínea, entretanto, permite o diagnóstico correto. Os testes de lise pelo glicerol e de crio-hemólise estão alterados na esferocitose hereditária. Resultados positivos do teste de lise pelo glicerol também são vistos em esferocitose por outras causas, persistência

hereditária da hemoglobina fetal, deficiência de piruvatoquinase, deficiência severa de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), em um terço das gestantes, em alguns pacientes com SMD e em pacientes com insuficiência renal crônica sob diálise [116]. Resultados positivos do teste de crio-hemólise também são encontrados na ovalocitose do Sudeste Asiático e na anemia diseritropoética congênita do tipo II [121]. O teste definitivo para a esferocitose hereditária, embora raramente necessário, é a dosagem da espectrina e das outras proteínas da membrana eritrocitária. A espectrina da membrana é normal na anemia hemolítica autoimune. Os estudos genéticos mais relevantes para cada caso podem ser previstos a partir do defeito demonstrado nas proteínas da membrana: espectrina e anquirina deficientes – investigar gene *ANK1*; espectrina deficiente – investigar genes *SPTB* e *SPTA*; e proteína 3 deficiente – investigar gene *SLC4A1*.

Com a disponibilidade cada vez mais ampla da citometria em fluxo para ligação EMA, a importância do teste de fragilidade osmótica diminuiu consideravelmente. Uma comparação dos testes de rotina para esferocitose hereditária em 150 pacientes, com vários defeitos genéticos, mostrou que a ligação à EMA tem sensibilidade de 93% e especificidade de 98% [118]. O teste de lise pelo glicerol acidificado, sensibilidade de 95%. O teste de fragilidade osmótica, de 68% em sangue fresco e de 81% em sangue incubado [118]. Os autores recomendam uma combinação de ligação de EMA com teste de lise pelo glicerol acidificado [118]. O British Committee for Standards in Haematology (BCSH) considera que não há necessidade de outros testes em casos com aspectos clínicos e laboratoriais típicos e história familiar positiva; quando houver aspectos, atípicos são recomendados citometria em fluxo com ligação de EMA e teste de crio-hemólise [122].

Elíptocitose e ovalocitose hereditárias

Elíptocitose hereditária

A condição designada elíptocitose hereditária na verdade é um grupo heterogêneo de condições genéticas, caracterizadas por eritrócitos elípticos. Sugeriu-se como critério diagnóstico a presença de pelo menos 25% de eliótócitos ou ovalócitos. Indivíduos com mutações eliptogênicas, entretanto, podem ter de 0 a 100% de eliótócitos, de modo que a seleção de qualquer *cut-off* percentual para diagnóstico é arbitrária e indesejável. A herança é geralmente autossômica dominante. Muitos grupos étnicos são afetados, incluindo brancos norte europeus, indivíduos de

ascendência africana, chineses, japoneses e indianos. A incidência é maior nas Áfricas Ocidental e Central, onde a prevalência é de pelo menos 6 a cada 1.000, e em Benim e outras áreas da África Central, onde pode chegar a 1% [106]. Em brancos, a prevalência é da ordem de 1 a cada 5.000.

A eliptocitose hereditária resulta de uma variedade de anormalidades genéticas que alteram a integridade do citoesqueleto eritrocitário [93, 107, 108, 123]. A maioria das mutações eliptogênicas afeta a estrutura da α ou da β -espectrina, causando uma cadeia truncada de β -espectrina ou um defeito nas cadeias α ou β , perto dos sítios envolvidos na autoconjugação dos heterodímeros da espectrina em tetrâmeros, isto é, no NH_2 terminal da cadeia de α -espectrina ou no COOH terminal da cadeia de β -espectrina. Como resultado, é rompida a ligação normal dos tetrâmeros de espectrina interconectados. No conjunto, cerca de 80% dos casos de eliptocitose hereditária são causados por mutação no gene da α -espectrina (*SPTA1*), cerca de 15%, por mutação no gene da proteína 4.1 (*EPB41*) e cerca de 5%, por mutação no gene da β -espectrina (*SPTB*) [94]. Mutações *SPTA* predominam em africanos, enquanto mutações *EPB41* são comuns em árabes [124]. Mais raramente, a eliptocitose é causada por uma mutação no gene da glicoforina (*GYPC*), dando origem ao raro fenótipo Leach (falta de expressão dos antígenos de grupo sanguíneo Gerbich, glicoforinas C e D, em associação com eliptocitose) [125]. A ovalocitose da região Wosera de Papua-Nova Guiné, está associada à negatividade Gervich e à deleção no gene *GYPC* [126]. Há, ainda, um gene no cromossomo X, cuja mutação causa

eliptocitose associada à síndrome de Alport [94]. Mutações associadas à eliptocitose estão listadas no *Human Gene Mutation Database* [101] e *Online Mendelian Inheritance in Man* [102].

A maioria dos pacientes com eliptocitose é assintomática, e o diagnóstico é feito acidentalmente; uma minoria tem anemia significativa. Algumas vezes, há anemia mais severa, com pecilocitose transiente, nos 2 primeiros anos de vida (ver adiante); pode haver necessidade transfusional no primeiro ano [127].

Hemograma

A severidade da eliptocitose hereditária varia consideravelmente, podendo apresentar-se como uma anormalidade sem interferência na sobrevida eritrocitária, como um estado de hemólise compensada de grau leve a moderado ou como uma anemia hemolítica crônica ou intermitente, de leve a severa. Na maioria dos casos, porém, não há anemia. A distensão sanguínea (Figura 8.44) mostra predominantemente eliptócitos ou, em alguns pacientes com o mesmo defeito genético, ovalócitos [123]. A hemoglobinizacão das células é normal. Quando há anemia, também há policromatofilia; os casos mais severos apresentam, às vezes, uma variedade de outros pecilócitos, incluindo fragmentos e esferócitos. Uma variante com esferoeliptócitos foi associada a uma variante da β -espectrina, a espectrina Rouen [128]. Outros casos de eliptocitose esferocítica de herança dominante (caracterizada pela presença de eliptócitos, esferócitos, microeliptócitos e microesferócitos) não têm base molecular conhecida [124]. Esferócitos e eliptócitos também são

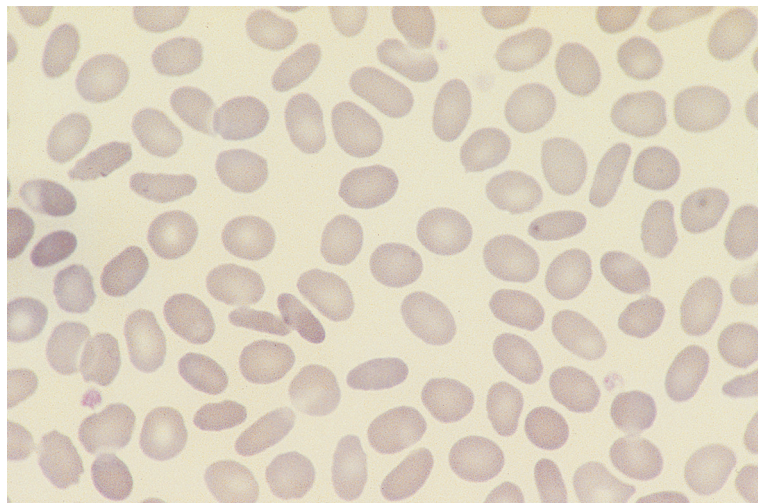


FIGURA 8.44 Distensão sanguínea de paciente com eliptocitose hereditária mostrando eliptócitos e ovalócitos. O paciente tinha Hb e contagem de reticulócitos normais.

vistos em pacientes com mutações da glicoforina C [124]. As alterações morfológicas são maiores nos que herdaram baixa expressão do alelo α^{Lely} do gene da α -espectrina, em *trans* com a variação eliptogênica [130]; esses pacientes costumam ter pecilócitos e fragmentos, além de eliptócitos, e podem ter aspectos clinicopatológicos de piropecilocitose hereditária (ver a seguir [131]). Reciprocamente, quando a mutação α^{Lely} ocorre em *cis* com uma mutação eliptogênica, a anormalidade fenotípica diminui.

Hb e índices hematimétricos geralmente são normais. A contagem de reticulócitos é normal ou aumentada. Casos com anemia hemolítica têm RDW aumentado. Os citogramas da série Siemens H.1 e Advia costumam ser normais, mas, em casos com hemólise, pode-se detectar aumento do número de células hiperdensas e hipodensas, e os histogramas de volume podem mostrar dupla população, normocítica e microcítica. A proporção de micrócitos correlaciona-se com a severidade da hemólise [132].

Na eliptocitose hereditária, há considerável variação na severidade do defeito, mesmo entre indivíduos com genótipo idêntico; em heterozigotos para alguns defeitos, o fenótipo varia de um estado assintomático, com menos de 2% de eliptócitos, até eliptocitose leve ou moderadamente severa [107, 108, 123]. Em indivíduos com o mesmo genótipo, há uma correlação entre o grau de anormalidade do formato do eritrócito e a severidade da hemólise. No entanto, os genótipos que causam hemólise severa com mais constância não são aqueles nos quais as células são mais elípticas ou nos quais a porcentagem de eliptócitos é mais alta [123]. Apesar da expressão variável, podem ser feitas algumas generalizações relativas

à expressão fenotípica usual das diferentes anormalidades genéticas [107, 108, 123]. A deficiência da glicoforina C não causa anormalidade significativa em heterozigotos, mas os homozigotos apresentam eliptocitose hereditária leve. A deficiência da proteína 4.1 e algumas variantes da α -espectrina provocam anormalidades mínimas ou leves em heterozigotos, mas eliptocitose hereditária severa nos homozigotos [108, 133, 134]. As mutações eliptogênicas mais severas em geral causam o fenótipo de eliptocitose hereditária nos heterozigotos, ao passo que os homozigotos e alguns heterozigotos compostos têm o fenótipo da piropecilocitose hereditária (ver a seguir).

Às vezes, há exacerbações da hemólise durante infecções, na gravidez [135], no puerpério, quando a microcirculação está comprometida ou há hiperplasia reticuloendotelial – por exemplo, em coagulação intravascular disseminada, púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), malária e mononucleose infecciosa [107, 123, 124]. Infecção por parvovírus B19 pode causar anemia significativa [136].

Pacientes com hemólise severa a ponto de exigir esplenectomia podem, depois desta, apresentar pecilocitose acentuada, além dos achados pós-esplenectomia habituais; os pecilócitos incluem esferócitos proeminentes, microeliptócitos e fragmentos (Figura 8.45). Pacientes com doença leve, que sofreram esplenectomia por outras razões (p. ex., após trauma), também costumam mostrar aspectos bizarros na distensão sanguínea após a esplenectomia.

De modo geral, indivíduos com eliptocitose hereditária têm muito poucos eliptócitos ao nascimento. Porém, alguns indivíduos que mais tarde apresentarão eliptocitose hereditária típica, com

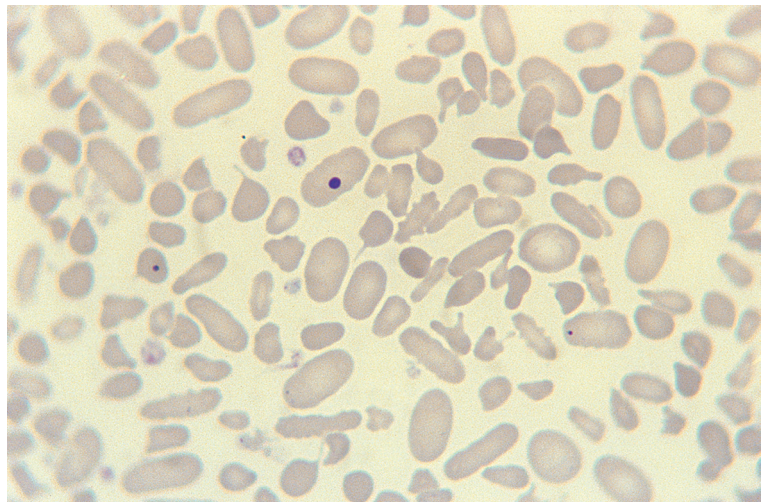


FIGURA 8.45 Distensão sanguínea de paciente com eliptocitose hereditária que foi esplenectomizado devido à hemólise mostrando pecilocitose acentuada, com eliptócitos, ovalócitos e fragmentos. Um ovalócito e um micrócito contêm corpos de Howell-Jolly. Cortesia da Dra. Raina Liesner, Londres.

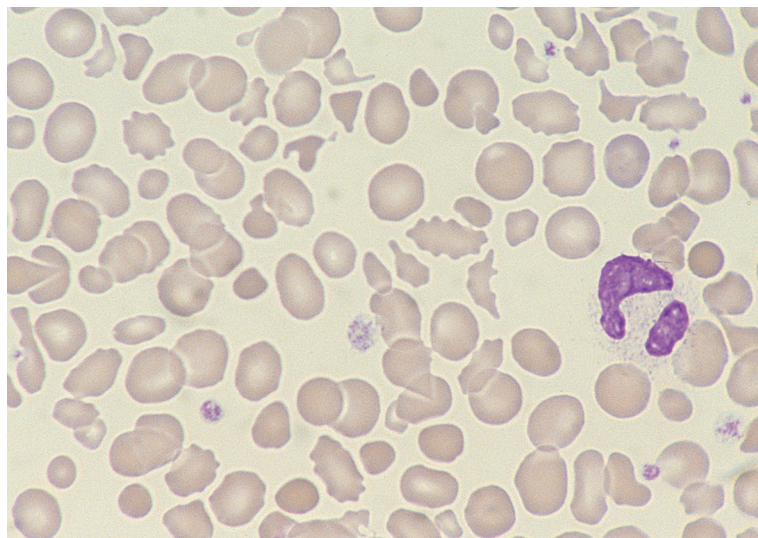


FIGURA 8.46 Distensão sanguínea de um recém-nascido com eliptocitose hereditária e pecilocitose neonatal mostrando pecilocitose acentuada, com uma mistura de eliptócitos e outros pecilócitos. Cortesia da Dra. Marily Treacy, Londres.

grau leve de hemólise, podem, no período neonatal, quando a hemoglobina F é alta, apresentar hemólise intensa e distensão sanguínea (Figura 8.46) mostrando pecilocitose acentuada, com a presença não somente de eliptócitos, mas também de fragmentos, eritrócitos irregularmente contraídos e microesferócitos [137, 138]. A explicação mais aceita para esse exagero de manifestações no período neonatal é que a hemoglobina F tem afinidade menor ao 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) do que a hemoglobina A, de modo que o 2,3-DPG resta livre e desestabiliza a interação espectrina-actina-proteína 4.1, exacerbando a anormalidade.

Diagnóstico diferencial

Quando a distensão sanguínea mostra elevada porcentagem de eliptócitos ou ovalócitos, o diagnóstico de eliptocitose hereditária é muito provável. Raros pacientes com mielofibrose em evolução [139] ou com SMDs [140] podem mostrar número similar de eliptócitos, e o achado pode ser atribuído a uma deficiência adquirida de proteína 4.1. Casos de eliptocitose hereditária com pecilocitose neonatal acentuada têm de ser diferenciados da piropecilocitose hereditária. O acompanhamento após o período neonatal permite que as duas condições sejam diferenciadas; a alteração do fenótipo pode tomar de 4 meses a 2 anos para completar-se [124].

Exames adicionais

A fragilidade osmótica é normal, exceto nos casos com hemólise intensa. Exames nos familiares são úteis para confirmar a natureza genética da

condição. O diagnóstico definitivo pode ser feito por investigação bioquímica da membrana eritrocitária em um laboratório de referência. A pesquisa dos antígenos de Gerbich é útil no reconhecimento do fenótipo de Leach. Há relatos de normalidade [117] e de anormalidade [141] do teste de ligação da EMA em casos de eliptocitose.

Piropecilocitose hereditária

A rara condição designada piropecilocitose hereditária corresponde a um grupo heterogêneo de anemias hemolíticas hereditárias caracterizado por herança recessiva e presença de pecilócitos bizarros, incluindo fragmentos de eritrócitos e microesferócitos. Foi descrita em populações brancas, negras e árabes. A condição é definida por um exagero de fragmentação eritrocitária ao aquecimento *in vitro*, que ocorre em temperatura mais baixa do que no caso de eritrócitos normais; tal característica é indicada no nome “piropecilocitose”. Eritrócitos de eliptocitose hereditária mostram um defeito semelhante, porém mais brando, à exposição ao calor. A membrana eritrocitária mostra dois defeitos: deficiência parcial de espectrina e defeito na automontagem dos dímeros da espectrina em tetrameros, este último como resultado de uma mutação eliptogênica. Pode ser a deficiência de espectrina (que não ocorre na eliptocitose hereditária típica) o que origina a presença simultânea de esferócitos e eliptócitos na piropecilocitose [124]. São vários os defeitos genéticos subjacentes [142]. Pode haver homozigose ou heterozigose composta para uma espectrina mutante, com um defeito

que afeta a automontagem dos dímeros, além de ser, também, rapidamente degradada. Alternativamente, pode haver heterozigose composta para uma espectrina mutante (cadeia α ou β) e para um defeito que leva a uma redução da velocidade de síntese da α -espectrina, α -espectrina^{Lely}, ocorrendo em *trans*. Os pais de pacientes com piropecilocitose podem, ambos, ter eritrócitos morfologicamente normais ou um deles – ocasionalmente, ambos – ter eliptocitose hereditária típica.

Pacientes com piropecilocitose hereditária têm anemia hemolítica severa. No período neonatal, a anemia é ainda mais severa, pois o 2,3-DPG liga-se menos à hemoglobina fetal do que à hemoglobina A, e o excesso de 2,3-DPG livre enfraquece as interações espectrina-actina.

Hemograma

Há anemia, e a distensão sanguínea (Figuras 8.47 e 8.48) mostra anisocitose e pecilocitose consideráveis; os pecilócitos incluem microesferócitos e eritrócitos com projeções semelhantes a brotos e fragmentos; os eliptócitos podem ser um componente minoritário ou majoritário. Às vezes, estão ausentes. Há diminuição da Hb e aumento da contagem de reticulócitos. VCM e HCM são acentuadamente diminuídos; o VCM pode ser de apenas 25 fL [77]. RDW e HDW estão aumentados. As alterações morfológicas costumam ser significativamente mais acentuadas no período neonatal.

Diagnóstico diferencial

No período neonatal, alguns casos de eliptocitose hereditária com pecilocitose acentuada lembram a

FIGURA 8.47 Distensão sanguínea de paciente com piropecilocitose hereditária mostrando numerosos esferócitos, outros pecilócitos e macrócitos policromáticos. Cortesia da Professora Irene Roberts, Oxford.

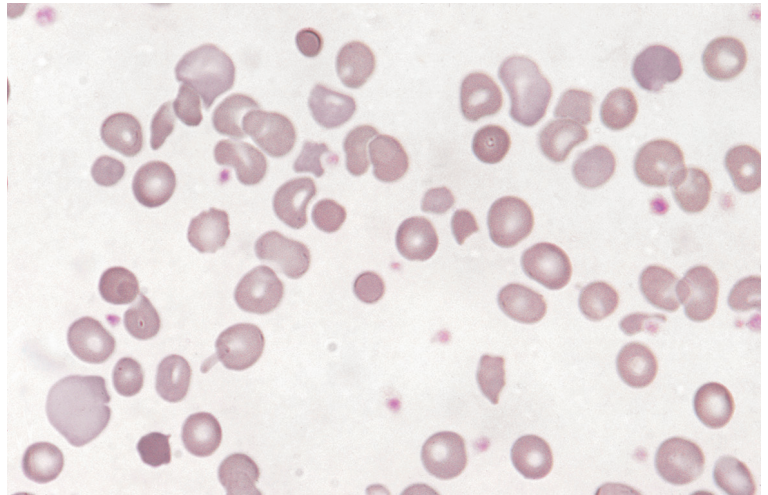
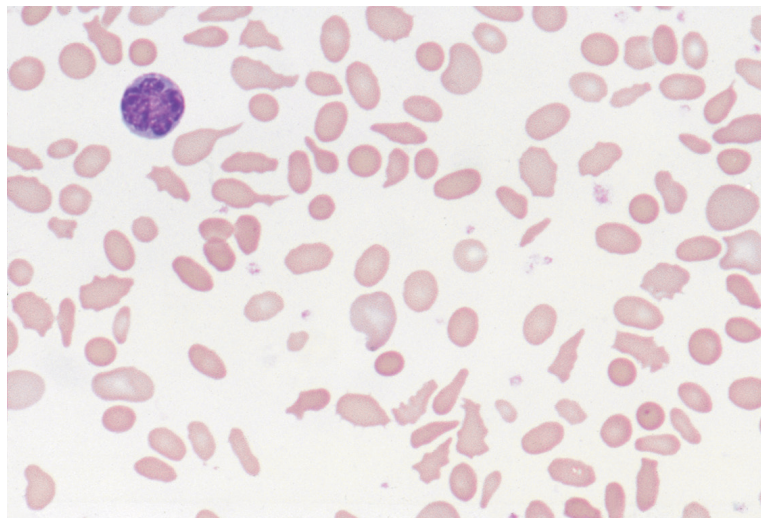


FIGURA 8.48 Distensão sanguínea de paciente com piropecilocitose hereditária mostrando acentuada pecilocitose e macrócitos policromáticos; entre os pecilócitos, eliptócitos e esferócitos são chamativos. Cortesia da Professora Irene Roberts, Oxford.



piropecilocitose hereditária. Homozigotos para deficiência de proteína 4.1 também têm anemia severa e eliptócitos fragmentados, mas têm estabilidade térmica normal [124]. A hemoglobinopatia H e as anemias diseritropoéticas congênitas às vezes também mostram grau similar de pecilocitose, mas não apresentam microesferócitos e eritrócitos em brotamento (*budding cells*). A piropecilocitose pode ser simulada pelo aquecimento acidental, *in vitro*, da amostra de sangue [143].

Exames adicionais

A fragilidade osmótica e a auto-hemólise estão aumentadas. O diagnóstico é confirmado pela demonstração da fragmentação à exposição ao calor *in vitro* e pela análise bioquímica das membranas eritrocitárias. A ligação de EMA, detectada por citometria em fluxo, é ainda mais reduzida do que na esferocitose hereditária [144].

Ovalocitose do Sudeste Asiático

A ovalocitose do Sudeste Asiático, também denominada ovalocitose hereditária dos melanésios ou eliptocitose estomatocítica, é um distúrbio distinto e homogêneo que ocorre em melanésios, em Papua-Nova Guiné, nas Ilhas Salomão e no Estreito de Torres, bem como nos aborígenes malaio, no sul da Tailândia, Camboja e Bornéu e em populações da Indonésia e das Filipinas. Foram descritos casos em negros da África do Sul [145]. Foi descrito apenas um caso em um índio mauriciano e também foram descritas apenas uma família branca

e uma afro-americana [96]. A herança é autossômica dominante. Em alguns dos grupos étnicos, 20-30% da população são afetados [146]. O defeito genético subjacente é a deleção de 9 códons no gene da banda 3 (*SLC4A1*), que causa ligação rígida da banda 3 com a anquirina, redução da mobilidade lateral e rigidez da membrana. Uma mutação polimórfica pontual no mesmo gene, o polimorfismo de Memphis, geralmente ocorre em *cis* com a deleção responsável por essa condição. Na ovalocitose do Sudeste Asiático, há um vazamento de cátions com as mesmas características da crio-hidrocitose [147].

Heterozigotos para a ovalocitose do Sudeste Asiático são completamente assintomáticos. Estudos epidemiológicos sugerem que a homozigose para essa mutação seja incompatível com a sobrevivência fetal.

Hemograma

Na grande maioria dos casos, não há anemia nem hemólise compensada; a exceção é o período neonatal em que pode haver anemia hemolítica significativa que persiste até os 2 anos [148]. Uma queda de Hb maior do que a habitual foi notada em heterozigotos dessa condição durante infecção intercorrente com *Plasmodium falciparum*, em comparação com pacientes sem defeito da membrana eritrocítica [149]. Os eritrócitos são redondos ou ovais e há estomatócitos. Há uma pequena população de macrovalócitos, muitos deles estomatocíticos (Figura 8.49). Os estomas podem ser longitudinais, transversos, em formato de “V” ou “Y” ou pode haver

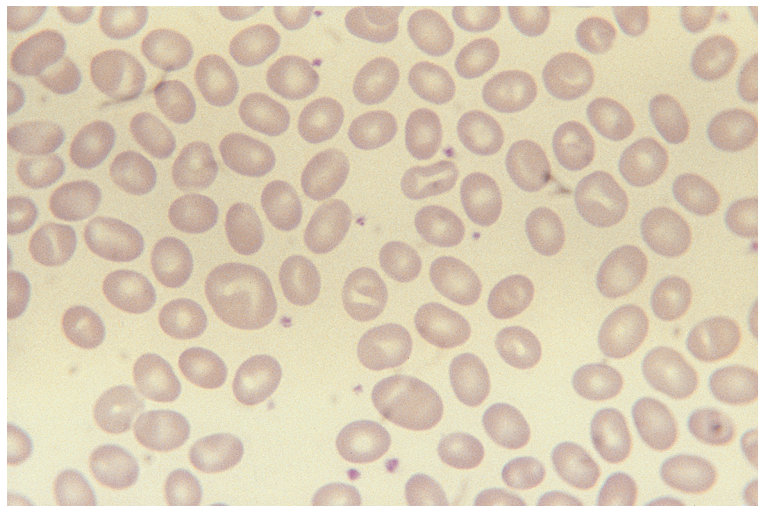


FIGURA 8.49 Distensão sanguínea de paciente com ovalocitose do Sudeste Asiático mostrando alguns macrovalócitos – um com estoma em formato de “V” e outro com estoma transversal excêntrico. Muitas das células menores são estomatócitos, ovalócitos ou estomato-ovalócitos.

dois estomas em uma única célula. Alguns casos confirmados por genética molecular não mostram ovalócitos, somente estomatócitos ou eritrócitos com múltiplas áreas claras irregulares ou lineares [149]. A contagem de reticulócitos é normal. Hb, VCM, HCM e CHCM são normais.

Diagnóstico diferencial

A distensão sanguínea na maioria dos pacientes é tão peculiar que, uma vez conhecidas as características dessa condição, ela dificilmente será confundida com qualquer outra.

Exames adicionais

A distensão sanguínea é patognomônica; portanto, são desnecessários outros exames. É possível, entretanto, o diagnóstico por análise genética molecular. Há expressão reduzida de muitos antígenos eritrocitários, incluindo o Rh D, de modo que os portadores podem ser tipificados como D^U [150]. A ligação de EMA é anormal, ao contrário da eliptocitose hereditária, em que costuma ser normal [117]. A fragilidade osmótica está diminuída [124].

Estomatocitose hereditária e condições correlatas

Estomatocitose hereditária e distúrbios correlatos são um grupo heterogêneo de anemias hemolíticas raras, de genética dominante, caracterizadas pela presença de estomatócitos nas distensões sanguíneas e/ou por aumento do fluxo de cátions pela membrana dos eritrócitos. Na maioria dos

casos, há aumento do sódio intracelular e baixa do potássio. Esses distúrbios são resumidos e caracterizados na Tabela 8.3 e serão discutidos individualmente a seguir.

Estomatocitose hereditária

Neste grupo heterogêneo de anemias hemolíticas genéticas raras, há um defeito na membrana dos eritrócitos que provoca a formação de estomatócitos hiperidratados. Uma designação alternativa é estomatocitose hereditária, variante hiperidratada, ou “hidrocitose”. Há aumento acentuado no fluxo de cátions. Na maioria das famílias afetadas, a condição deve-se a uma mutação no gene *RHAG* [156]. A membrana do eritrócito mostra expressão reduzida de estomatina. A expressão da glicoproteína associada Rhesus (RHAG) é levemente reduzida e está presente uma proteína RHAG eletroforeticamente anormal [156]. Em famílias nas quais a estomatocitose é parte de uma síndrome, que inclui também anormalidades neurológicas, esse gene não está envolvido [156].

A hemólise pode ser intensa e os pacientes são cronicamente ictericos. Trombose pós-esplenectomia tem sido um problema quando esse tratamento é indicado. Infecção intercorrente por parvovírus B19 causa uma anemia gravíssima que pode ser fatal [161].

Hemograma

A hemólise pode estar compensada, ou pode haver anemia leve, moderada ou severa. A distensão

TABELA 8.3 Estomatocitose hereditária e condições correlatas [151-160]

Condição	Distensão sanguínea	Outras características	Mutação genética
Estomatocitose hereditária, variante hiperidratada	Estomatócitos	Anemia hemolítica leve ou severa	<i>RHAG</i> em 6q12.3 [156]
Xerocitose ou estomatocitose hereditária, variante desidratada	Eritrócitos em alvo e, às vezes, também estomatócitos	Anemia hemolítica ou hemólise compensada; pode haver edema e ascite perinatal	<i>PIEZO1</i> em 16q24.3 [157, 158]
Pseudo-hiperpotassemia familiar	Normal	Hemólise compensada; perda de potássio à temperatura ambiente	<i>PIEZO1</i> em 16q24.3 [157, 158]
Crio-hidrocitose	Estomatócitos	Anemia hemolítica leve ou moderada, com perda de potássio em baixas temperaturas	<i>SLC4A1</i> em 17q21.31 na maioria dos casos [159]
Crio-hidrocitose deficiente em estomatina	Estomatocitose (2 casos)	Anemia hemolítica com perda aumentada de ânions, crio-hidrocitose, catarata e retardo de desenvolvimento neurológico	<i>SLC2A1</i> em 1p34.2 [160]

sanguínea (Figura 8.50) mostra um número variável de estomatócitos, geralmente 10-30%; pode haver pontilhado basófilo. Também há macrócitos, equinócitos e células em alvo [156].

O VCM está aumentado e a CHCM, diminuída. Os citogramas mostram presença de macrócitos normocrômicos e, particularmente, hipocrômicos. O HDW está aumentado. O eritrograma típico foi estimado com Hb 8 a 10 g/dL, VCM 120 fL, CHCM 28 g/dL e reticulócitos 10-30% [124]. Uma alteração dos índices *ex vivo* pode ser útil ao diagnóstico: o armazenamento do sangue, à temperatura ambiente ou a 4°C até o dia seguinte, causa aumento do VCM de 95-98 fL para 110-120 fL, com queda correspondente da CHCM [127].

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita com outras condições genéticas caracterizadas pela presença de estomatócitos e com os casos muito mais frequentes de estomatocitose adquirida (ver Capítulo 3). A doença do Rh nulo (ver Tabela 8.4) tem muitas características em comum com a estomatocitose hereditária. As distensões sanguíneas mostram número semelhante de estomatócitos e alguns esferócitos. O fluxo de cátions é anormal. Há anemia hemolítica leve ou hemólise compensada. A demonstração da falta de todos os antígenos Rh permite o estabelecimento do diagnóstico. Estomatócitos também são um aspecto da estomatocitose mediterrânea/macrotrombocitopenia (ver a seguir) [162].

Exames adicionais

A fragilidade osmótica está aumentada. Pode haver pseudo-hiperpotassemia sérica, devido ao extravasamento do potássio intracelular quando há demora no processamento de amostras de sangue no laboratório; essa alteração pode ser procurada em casos suspeitos de estomatocitose. Está indicada tipagem sanguínea para excluir a doença do Rh nulo. A ligação de EMA está aumentada [127].

Xerocitose hereditária

Xerocitose hereditária, também denominada variante desidratada da estomatocitose hereditária, é uma anemia hemolítica genética rara, caracterizada por fluxo aumentado de cátions, conteúdo celular de cátions normal ou aumentado e perda de água do eritrócito. A herança é autossômica dominante, com penetrância variável. Pode ocorrer pseudo-hiperpotassemia sérica. Ascite fetal e neonatal e edema periférico de neonatos foram descritos [163]. Essa doença é a mesma anteriormente descrita como “anemia hemolítica por alta fosfatidilcolina” [155, 164]. É mais benigna e mais comum do que a anemia hemolítica da variante hiperidratada de estomatocitose hereditária. Xerocitose hereditária e síndromes relacionadas resultam de uma mutação no gene *PIEZO1* que codifica um componente do canal de cálcio [157, 158]. Tem sido descrita trombose pós-operatória em pacientes tratados com esplenectomia [155].

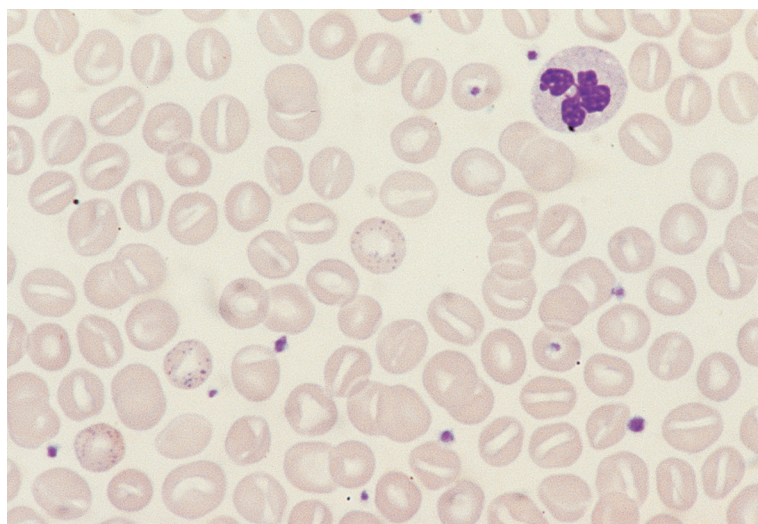


FIGURA 8.50 Distensão sanguínea de paciente com estomatocitose hereditária mostrando pontilhado basófilo e numerosos estomatócitos [84]. Cortesia da Dra. Carol Barton, Reading.

Hemograma

Alguns pacientes são anêmicos, outros têm hemólise compensada. A distensão sanguínea (Figuras 8.51 e 8.52) mostra eritrócitos em alvo, estomatócitos às vezes em pequeno número, equinócitos, eritrócitos irregularmente contraídos e eritrócitos com a hemoglobina concentrada ou “amassada” (*puddled*) na periferia, ou em uma ou duas margens da célula [165]. Há policromatofilia e reticulocitose. Os estomatócitos podem ser mais proeminentes em preparações a fresco.

O VCM é normal ou alto e a CHCM pode estar elevada. RDW e HDW estão aumentados. O eritrograma típico foi estimado com Hb 11 a 14 g/dL, VCM 110-120 fL, CHCM 36-37 g/dL e reticulócitos 5-10% [124]. O citograma dos instrumentos Siemens pode mostrar uma população de células hiperdensas.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as demais anemias hemolíticas, particularmente com as condições que apresentam estomatócitos ou eritrócitos em alvo.

Exames adicionais

A fragilidade osmótica está diminuída, embora possa existir uma pequena cauda de células frágeis. A demonstração de uma população de células com CHCM aumentada é útil para o diagnóstico. Se houver demora na dosagem do potássio sérico, os pacientes poderão ter pseudo-hiperpotassemia, devida ao vazamento do potássio celular. O tempo de

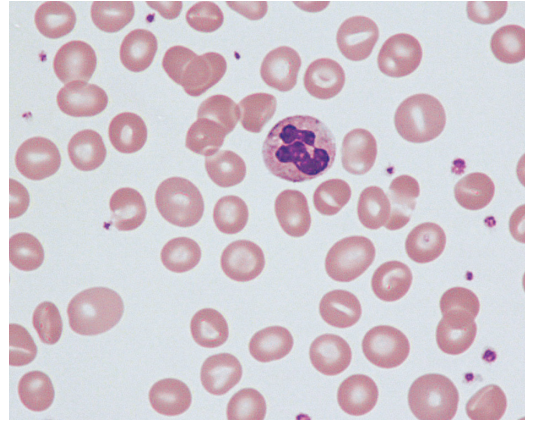


FIGURA 8.52 Distensão sanguínea de paciente com xerocitose hereditária, mostrando estomatócitos e várias células densas com palidez central escassa ou ausente. Cortesia do Dr. Mark Layton, Londres.

lise em glicerol ácido é normal e a ligação de EMA é normal ou aumentada [127].

Pseudo-hiperpotassemia familiar

O termo refere-se a um grupo heterogêneo de defeitos na membrana eritrocitária que causam fluxo aumentado de cátions, com perda de potássio dos eritrócitos para o plasma à temperatura ambiente [155, 166]. O diagnóstico decorre do esclarecimento de uma elevação da dosagem de potássio sérico, que se mostra falsa. Em algumas famílias, a anormalidade deve-se a uma mutação *PIEZO*, indicando

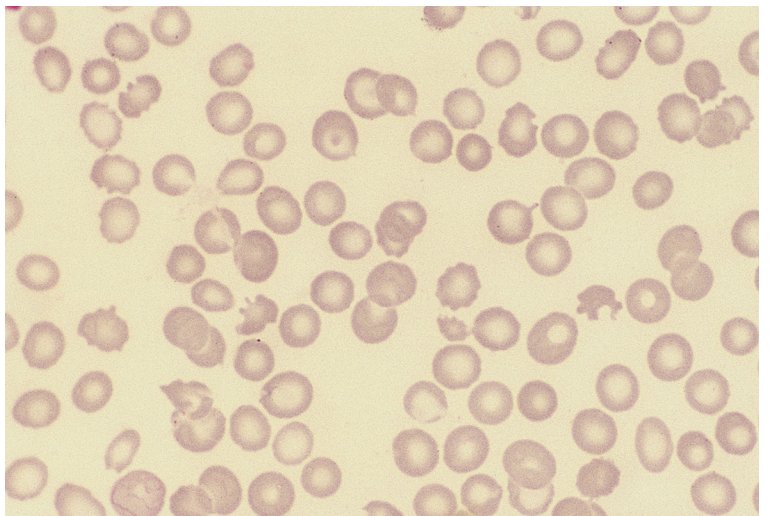


FIGURA 8.51 Distensão sanguínea de paciente com xerocitose hereditária mostrando eritrócitos em alvo, pecilócitos e alguns eritrócitos cuja hemoglobina distribui-se desigualmente dentro da célula (*puddled*). Cortesia do Dr. Joan Luis Vives Corrons, Barcelona.

relação próxima à xerocitose hereditária. Em outras famílias, é provavelmente uma variante leve da crio-hidrocitose hereditária [124].

Hemograma

Há hemólise totalmente compensada, de modo que a Hb é normal, mas pode haver moderada reticulocitose. A distensão sanguínea não mostra estomatócitos. Pode haver macrocitose leve e o VCM eleva-se acentuadamente à conservação do sangue à temperatura ambiente ou em refrigerador [167].

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a estomatocitose hereditária e com outros defeitos causadores de pseudo-hiperpotassemia. A normalidade dos achados na distensão e a insignificância da hemólise, distinguem-na dos distúrbios similares.

Crio-hidrocitose

O termo refere-se a um grupo heterogêneo de distúrbios muito raros com aumento do fluxo de cátions, perda de potássio e hemólise *in vitro* a baixas temperaturas [168]. Conservados em baixa temperatura, os eritrócitos incham, de modo que aumenta o VCM e diminui a CHCM. A esplenectomia não traz benefício clínico, mas não há referência a ter causado efeito deletério [169]. A condição deve-se geralmente a uma mutação em *SLC4A1* (que codifica o trocador de ânions 1, banda 3) [159]. Outros pacientes com mutação nesse gene também têm vazamento de cátions dos eritrócitos a baixa temperatura, mas têm esferocitose em vez de estomatocitose, e pode ser considerada uma variação de esferocitose hereditária resultante da deficiência de banda 3 [159].

Hemograma

Há anemia hemolítica ou hemólise compensada. A distensão mostra estomatócitos e macroesferócitos [169]. A CHCM está aumentada quando o sangue é imediatamente examinado e diminui com a conservação, enquanto o VCM se eleva [155]. Em armazenamento a temperaturas de refrigerador, o processo é mais intenso do que à temperatura ambiente.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com os demais tipos de estomatocitose e de pseudo-hiperpotassemia. Pode ocorrer um diagnóstico errôneo de esferocitose hereditária porque o armazenamento em baixa temperatura causa aumento do número de macroesferócitos e da fragilidade osmótica [169]. A ligação a EMA pode estar diminuída [127].

Outros testes

O potássio sérico costuma estar aumentado. Armazenamento a 4°C até o dia seguinte causa hemólise e aumento do potássio extracelular.

Crio-hidrocitose com deficiência de estomatina

Essa condição muito rara tem um fenótipo intermediário entre o da estomatocitose hiperidratada (eritrócitos estomatocíticos deficientes em estomatina) e crio-hidrocitose (eritrócitos sensíveis ao frio). Deve-se a uma mutação no gene *SLC2A1* [160]. Há moderada anemia hemolítica com crises episódicas. Há anormalidades neurológicas associadas (retardo mental leve ou severa, convulsões), retardo de crescimento, cataratas e grande esplenomegalia [160, 170].

Em paciente descrito com a mesma síndrome neurológica e mutação em *SLC2A1*, havia equinocitose e não estomatocitose [171].

Sitosterolemia

Sitosterolemia, também conhecida como fitosterolemia, é um distúrbio autossômico recessivo resultante de mutação em *ABCG5* ou *ABCG8* em 2p21, no qual há absorção não seletiva e não restrita do colesterol da dieta e de moléculas vegetais semelhantes ao colesterol (fitosteróis) [172]. Os fitosteróis séricos estão aumentados, e o colesterol geralmente também está. Além das manifestações hematológicas, a condição caracteriza-se por baixa estatura e xantomas; pode haver esplenomegalia. Essa rara condição tem sido descrita em indivíduos do norte e do leste da Europa, em chineses, japoneses e em uma família indiana [162, 172].

Uma condição semelhante descrita em 1975 em australianos de origem grega e balcânica (só em Adelaide e Perth) e designada estomatocitose mediterrânea/macrotrombocitopenia parece ter sido uma condição adquirida; especula-se que um contaminante do óleo de oliva possa ter sido o responsável [173].

Hemograma

Mostra sinais de leve hemólise e estomatocitose acentuada. Há trombocitopenia com plaquetas grandes.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outras causas de estomatocitose e de trombocitopenia com VPM elevado (macrotrombocitopenia).

Outros defeitos da membrana do eritrócito

Outros defeitos genéticos raros da membrana, capazes de provocar anemia hemolítica, estão resumidos na Tabela 8.4. Além desses, a hipercolesterolemia familiar associa-se com um defeito na membrana e com encurtamento da sobrevida eritroide sem alterações morfológicas das células [180]. Quando esses pacientes são tratados com plasmaférese, a hemólise aumenta e, subsequentemente, desenvolve-se anemia ferropênica.

Anormalidades enzimáticas do eritrócito

O eritrócito contém muitas enzimas cruciais para manter sua integridade. As vias enzimáticas mais importantes são a via glicolítica, que fornece energia, e o *shunt* da pentose, que protege contra dano oxidante. Essas vias são apresentadas em detalhes nas Figuras 8.53 e 8.54. Outras enzimas relacionam-se ao metabolismo dos nucleotídios. Deficiências em qualquer dessas vias podem causar anemia hemolítica. Mutações específicas associadas com anemia hemolítica não esferocítica estão listadas

TABELA 8.4 Outras anemias hemolíticas hereditárias raras causadas por defeitos da membrana eritrocítica [171, 174-179]

Defeito	Defeito antigênico ou bioquímico e anomalia genética (quando conhecida)	Aspectos hematológicos	Anomalias associadas
Fenótipo McLeod [174]	Falta de antígeno Kx, codificado pelo gene <i>KX</i> em Xp21; antígenos Kell geralmente reduzidos	Acantocitose, hemólise compensada	Anomalias musculares e neurológicas de começo tardio (neuropatia e movimentos coreiformes), miocardiopatia; quando causada por uma deleção ampla, pode ocorrer associada à doença granulomatosa crônica, à distrofia muscular de Duchenne ou à retinite pigmentosa
Neuroacantocitose [175]	Antígenos Kell e Kx normais, mutações no gene <i>CHAC</i> ou no gene <i>JP3</i> (ver p. 81)	Acantocitose	Movimentos distônicos e coreiformes (doença de Huntington atípica)
Acantocitose, eritrócitos com vazamento de ânions [176, 177]	Mutação <i>SLC4A1</i>	Acantocitose, eritrócitos com aumento da perda de ânions	
Equinocitose com vazamento de cátions	Mutação <i>SLC2A1</i>	Equinocitose, eritrócitos com perda de cátions	Discinesia induzida pelo exercício [171]
Deficiência genética de CD59 [178]	Herança autossômica recessiva de deficiência de CD59	Anemia hemolítica crônica semelhante à hemoglobinúria paroxística noturna adquirida	
Síndrome de deficiência Rh [179]	<p>Rh_{nulo} Falta de todos os antígenos Rh, LW e Fy5, expressão reduzida de CD47, Ss e U, causada por homozigose para um alelo silencioso no locus <i>RH</i> ou homozigose para um gene supressor autossômico <i>X^{Yr}</i>, um alelo no locus <i>RHAG</i> (glicoproteína associada ao Rh)</p> <p>Rh_{mod} Expressão reduzida dos antígenos Rh causada por mutações no gene <i>RHAG</i></p>	Anemia hemolítica crônica ou hemólise compensada, com esferócitos e estomatócitos; fragilidade osmótica aumentada	

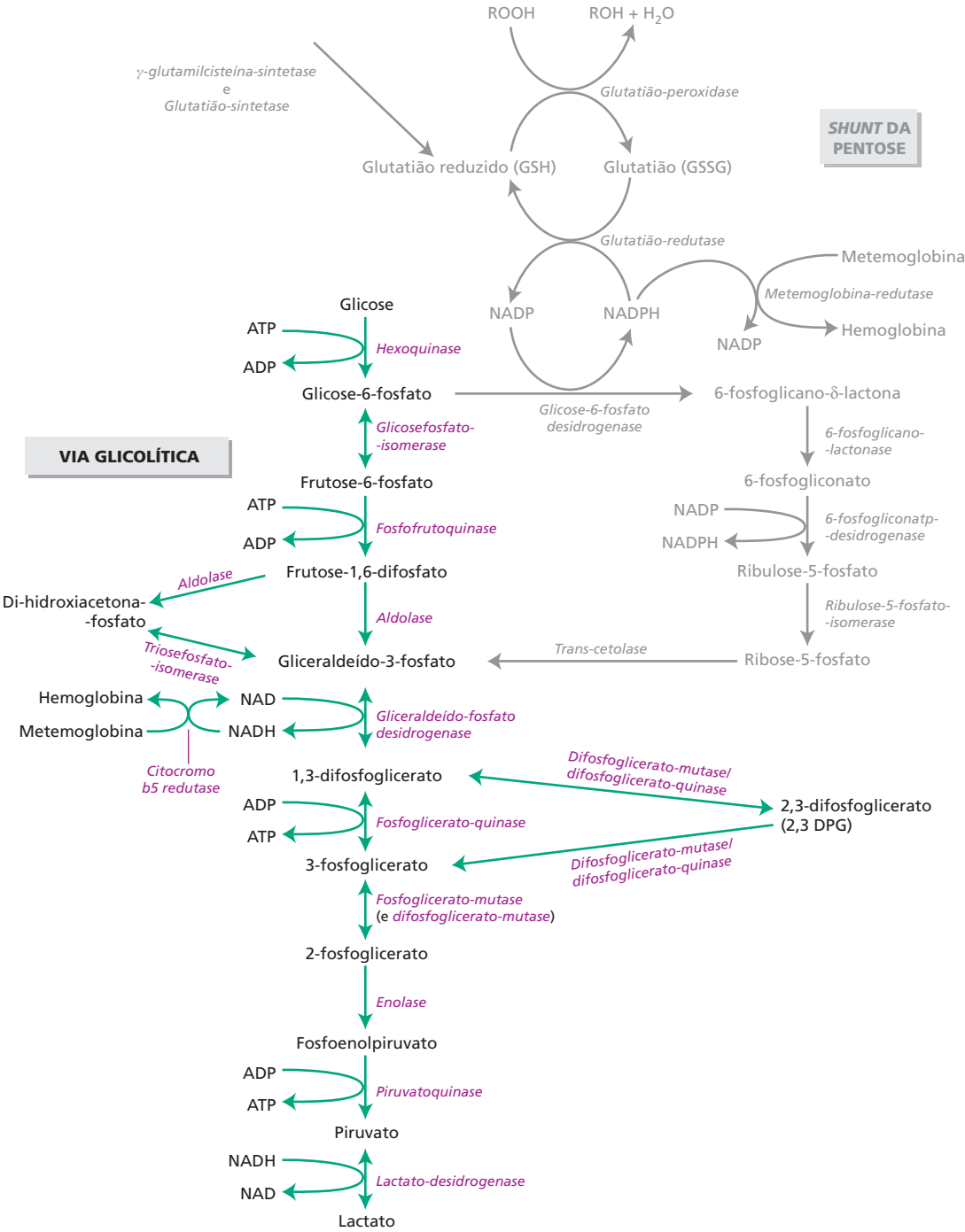


FIGURA 8.53 Metabólitos (caracteres preto) e enzimas (caracteres roxo) da via glicolítica do eritrócito (via Embden-Meyerhoff).

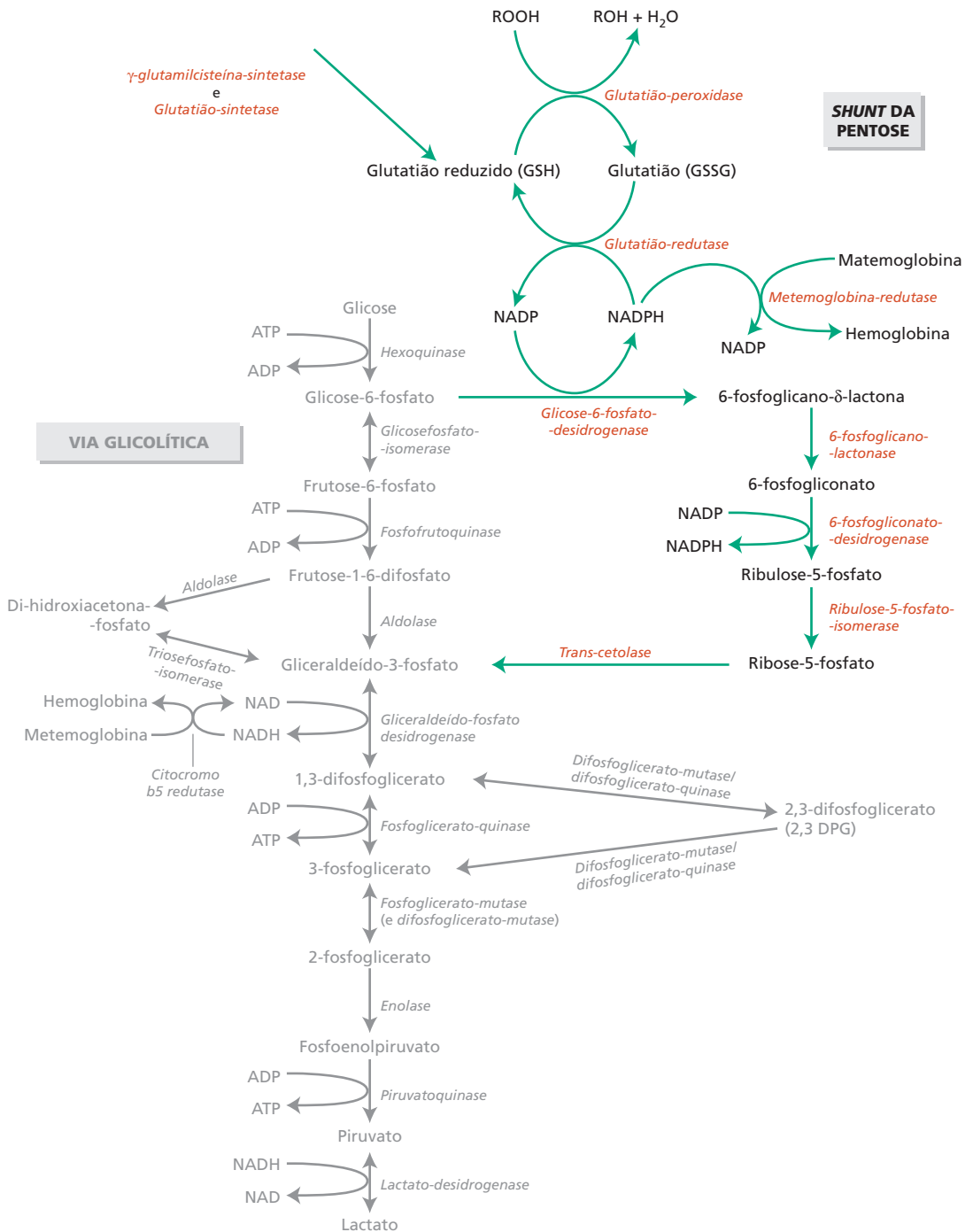


FIGURA 8.54 Metabólitos (caracteres preto) e enzimas (caracteres cor-de-laranja) das vias metabólicas que mantêm o potencial redutor dos eritrócitos (incluindo o shunt da pentose).

no Human Gene Mutation Database [101] e Online Mendelian Inheritance in Man [102].

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

G6PD é uma enzima do *shunt* da pentose. A deficiência de G6PD é comum em muitos grupos étnicos, incluindo muitas populações africanas, afro-caribenhos, afro-americanas, assim como populações que circundam a bacia do Mediterrâneo, do Oriente Médio, do subcontinente indiano e do Sudeste Asiático, além de Papua-Nova Guiné. O gene para a G6PD está no cromossomo X, de modo que a grande maioria dos casos de deficiência de G6PD ocorre em homens hemizigóticos, mas, em populações com alta incidência de genes mutantes, a deficiência também ocorre em mulheres homozigóticas. Devido à inativação randômica de um dos cromossomos X (Lyonização), algumas mulheres heterozigóticas podem manifestar sintomas do defeito. Pode ocorrer hemólise por essa causa em mulheres que receberam transplante de células-tronco hematopoéticas de um homem com a deficiência. Em algumas regiões da Grécia e do Oriente Médio, a incidência no sexo masculino chega a 35-40%. Dependendo da severidade do defeito, a deficiência de G6PD pode apresentar-se como icterícia neonatal, anemia hemolítica não esferocítica congênita ou hemólise intermitente desencadeada por estresse oxidante, como o causado por infecção intercorrente pela ingestão de favas ou por exposição a naftaleno ou a drogas oxidantes. Homens da região mediterrânea com deficiência de G6PD podem ter redução constante e estável da sobrevida eritrocitária

média de 120 para 100 dias, redução da haptoglobina plasmática [181] e da hemoglobina média (cerca de 0,15 g/dL) em relação à população similar não deficiente [182]. Icterícia neonatal ocorre em um terço dos homens acometidos, devendo-se mais à insuficiência hepática relativa do que à hemólise [183]. Na falta de assistência médica, podem até desenvolver *kernicterus*. A hemólise intermitente induzida por agentes oxidantes é aguda e parcialmente intravascular, causando tanto hemoglobinúria como icterícia.

Hemograma

Na grande maioria de pacientes com deficiência de G6PD, o hemograma é normal, exceto durante episódios hemolíticos. Nesses eventos, as anormalidades morfológicas são características (Figuras 8.55 e 8.56). Há eritrócitos irregularmente contraídos, alguns com pequenas protrusões causadas pela presença de corpos de Heinz. Queratócitos, também denominados “células mordidas” (*bite cells*), têm uma abertura irregular no contorno, provocada provavelmente pela remoção de corpos de Heinz pelo baço. Em outros eritrócitos, denominados hemiestromas (*hemighosts* ou *blister cells*), a hemoglobina parece ter se retraído, formando uma massa densa que ocupa metade da célula, enquanto o resto da célula mostra-se vazio. Quando a hemólise é súbita e intensa, podem estar presentes alguns estromas totalmente vazios de hemoglobina. No ápice do episódio hemolítico, há leucocitose neutrófila, e, como consequência da sobrecarga reticuloendotelial, podem aparecer sinais de

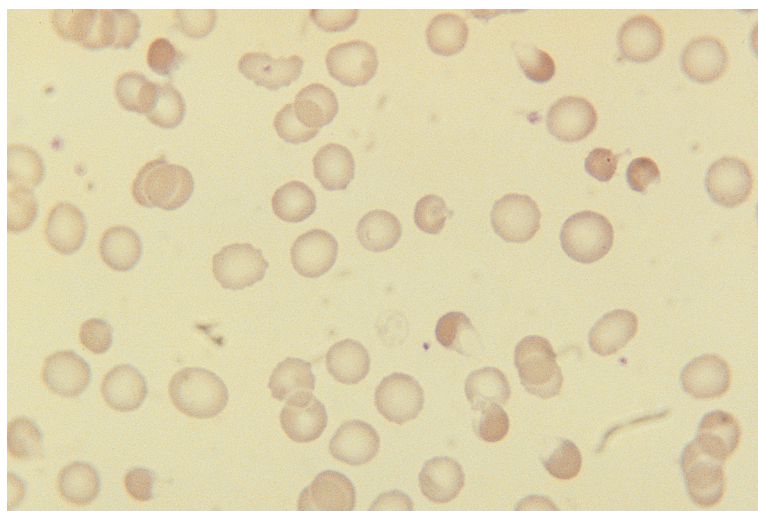
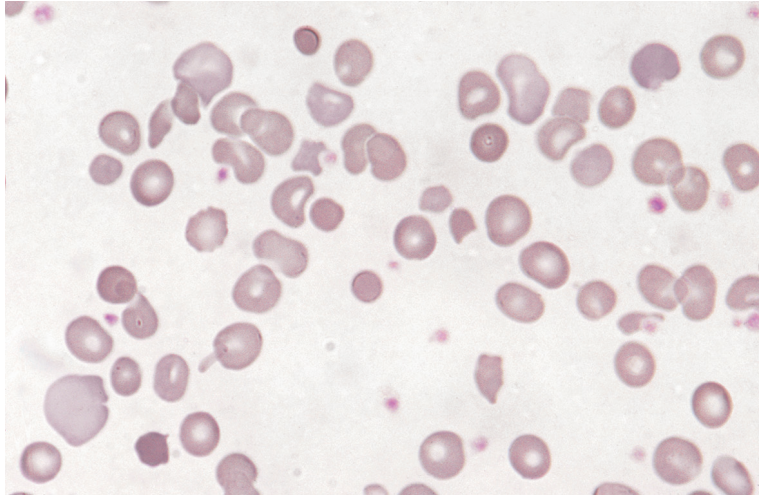


FIGURA 8.55 Distensão sanguínea de criança afro-caribenha com deficiência de G6PD logo após episódio agudo de hemólise, mostrando anemia, células irregularmente contraídas, um hemiestroma, um estroma completo e uma célula com protrusão atribuível à presença de um corpo de Heinz; a preparação para corpos de Heinz foi positiva.

FIGURA 8.56 Distensão sanguínea de paciente com hemólise aguda associada com deficiência de G6PD, mostrando uma “célula mordida”, uma célula com a hemoglobina retraída.

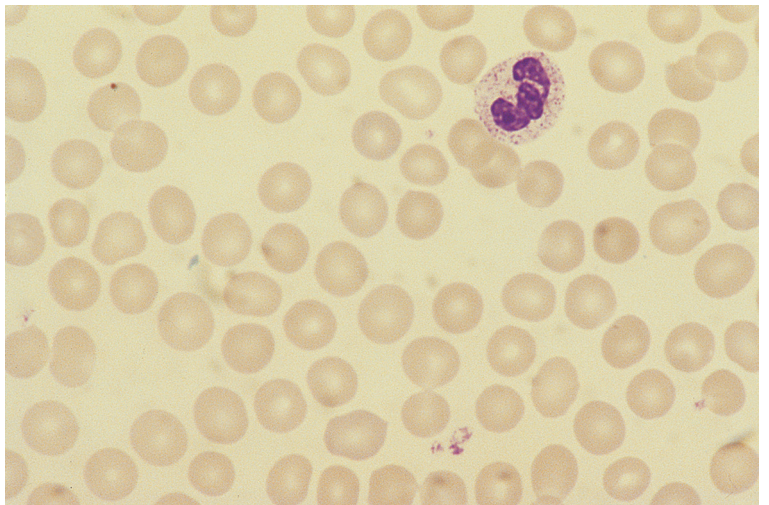


hipoesplenismo. Nos dias subsequentes ao episódio de estresse oxidante, costuma haver nova queda da Hb, já que os eritrócitos lesados continuam a ser removidos pelo baço. Em seguida, aparecem macrócitos policromáticos.

Quando há anemia hemolítica crônica decorrente de deficiência severa de G6PD, que é rara, a distensão sanguínea (Figura 8.57) pode mostrar anisocitose, pecilocitose, pontilhado basófilo, macrocitose e policromatofilia, mas não há achados diagnósticos específicos. Em pacientes com anemia hemolítica não esferocítica crônica, causada por deficiência de G6PD, a hemólise pode ser exacerbada por infecção ou outro estresse oxidante.

Pacientes deficientes em G6PD com anemia hemolítica não esferocítica crônica apresentam redução de E, Hb e Hct, além de aumento do VCM e da HCM. Pacientes com hemólise episódica só apresentam redução de E, Hb e Hct durante as crises; a anemia é acompanhada de aumento do RDW, do surgimento de uma população de células com concentração de hemoglobina aumentada e, se a hemólise for muito rápida, de um aumento da CHCM. Quando inicia a recuperação, com a reticulocitose, ocorre novo aumento do RDW, assim como aumento do VCM, do HCM e do HDW. Notou-se em um trabalho que, nesses pacientes masculinos hemizigóticos, a Hb é mais baixa (média 14,12 g/dL) do que na população

FIGURA 8.57 Distensão sanguínea de paciente com anemia hemolítica não esferocítica congênita causada por deficiência de G6PD. Há macrocitose e policromasia leves, difíceis de notar. Cortesia do Professor Luciano Luzzatto, Florença.



normal (média 15,68 g/dL) [182]. Notou-se no mesmo estudo que, pela leve reticulocitose, o VCM também é um pouco aumentado (média 90,16 fL) em relação ao da população (média 87,54 fL) [182]. Mulheres heterozigóticas mostram leve mas significativa diminuição na contagem de eritrócitos e hematócrito, e aumento igualmente leve mas significativo de VCM e HCM [182].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial no período neonatal inclui as demais causas de icterícia, particularmente a doença hemolítica do recém-nascido de causa imunológica. Nos casos que apresentam hemólise crônica, o diagnóstico diferencial inclui as demais causas de anemia hemolítica não esferocítica congênita (ver a seguir). Em pacientes com hemólise intermitente, o diagnóstico diferencial inclui outros defeitos, todos raros, do *shunt* da pentose e da anemia hemolítica devida à exposição a drogas ou a agentes químicos oxidantes em paciente sem deficiência enzimática subjacente; quando há dano oxidante aos eritrócitos, as distensões sanguíneas são indistinguíveis, exista ou não um defeito enzimático subjacente. Por fim, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial as demais causas de aparecimento de eritrócitos irregularmente contraídos, como a devida a hemoglobinas instáveis.

Exames adicionais

Há hemoglobinúria e pode haver hemoglobina livre no plasma durante episódios hemolíticos. A haptoglobina está muito diminuída ou ausente. Há aumento da bilirrubina não conjugada (indireta). O diagnóstico baseia-se em testes de triagem para a deficiência da G6PD ou na dosagem da enzima. Testes de triagem são convenientes para levantamentos populacionais. Durante episódios hemolíticos, a alta contagem de reticulócitos pode fazer os testes de triagem, e mesmo as dosagens, ficarem transitariamente normais. Isso ocorre com mais frequência em indivíduos de etnia africana, que geralmente têm uma mutação associada a níveis relativamente elevados de G6PD nos reticulócitos. Também pode acontecer com mulheres heterozigóticas que hemolisam, pois os eritrócitos deficientes serão lisados seletivamente, deixando na circulação os eritrócitos com G6PD próxima ao normal [184]. Quando houver suspeita de deficiência de G6PD, pela história clínica e pelo hemograma, e a dosagem for normal, deve-se repeti-la após normalização da contagem de reticulócitos.

Em alguns países com alta prevalência de deficiência de G6PD, é feita rotineiramente triagem neonatal no sangue do cordão.

Deficiência de piruvatoquinase

A deficiência de piruvatoquinase é a anemia hemolítica congênita não esferocítica mais comum dentre as decorrentes de deficiências enzimáticas na via glicolítica, com prevalência de cerca de 1 a cada 20 mil [185], similar à da anemia hemolítica não esferocítica por deficiência de G6PD. A deficiência é clinicamente recessiva, de modo que os indivíduos acometidos são homozigóticos ou, com maior frequência, duplamente heterozigóticos para variantes deficientes distintas. O diagnóstico deve ser suspeitado quando há icterícia e hemólise neonatais sem causa imunológica ou anemia hemolítica na infância ou no adulto sem alterações morfológicas esclarecedoras. A severidade da anemia é variável, mas são raros os pacientes dependentes de reposição transfusional. Há casos descritos de hidropisia fetal [185]. Hematopoese extramedular pode causar compressão da medula espinal [185]. Úlceras das pernas ocorrem ocasionalmente [186]. A anemia pode agravar-se na intercorrência de infecções, estresse oxidante, gravidez e, talvez, pelo uso de contraceptivos orais [187]. Súbita piora da anemia também pode resultar de aplasia eritroide por parvovírus B19. Sobrecarga de ferro ocorre algumas vezes, especialmente em indivíduos simultaneamente heterozigóticos para hemocromatose familiar.

A deficiência de piruvatoquinase está associada a níveis aumentados de 2,3-DPG, o que torna a sintomatologia mais amena do que a esperada para o grau de anemia.

Hemograma

Há anemia crônica, de leve a muito severa, ou hemólise compensada. A distensão sanguínea (Figura 8.58) mostra apenas aspectos não específicos, como policromatocitose, anisocitose e macrocitose. Podem ser vistos ocasionais ovalócitos e eliptócitos e pequeno número de eritrócitos espiculados densamente corados; um relato menciona 3 a 30% de eritrócitos espiculados em 15% de 61 pacientes [185]. Postulou-se que se tratavam de eritrócitos depletados de trifosfato de adenosina (ATP), no fim da sobrevivência no sangue. A presença de eliptócitos foi atribuída à diseritropoese associada, mas um número tão significativo sugere coexistência de um defeito da membrana [188]. Há reticulocitose, mas,

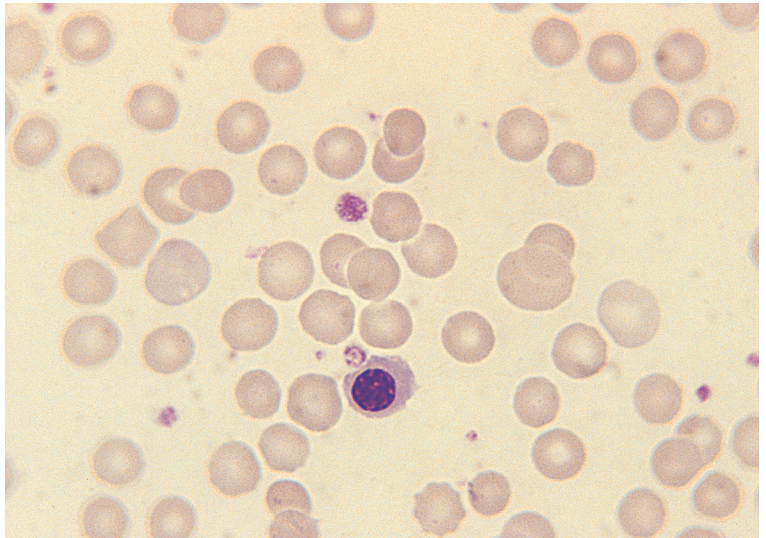


FIGURA 8.58 Distensão sanguínea de paciente com deficiência de piruvatoquinase, mostrando anisocitose, macrocitose, policromatofilia e um eritroblasto.

pela alta concentração de 2,3-DPG, é menor do que a prevista para o nível de hemoglobina. Alguns pacientes têm leucopenia por hiperesplenismo.

Após esplenectomia, Hb aumenta de 1-3 g/dL e o VCM e a HCM também podem aumentar; na maioria dos casos, os pacientes esplenectomizados passam a mostrar número apreciável de eritrócitos espiculados, semelhantes a acantócitos ou equinócitos atípicos (Figura 8.59) [189]. Pode haver um aumento paradoxal na contagem de reticulócitos para 40-70%, apesar da melhora da hemólise; a

explicação provável é que, antes da esplenectomia, alguns eritrócitos novos altamente defeituosos eram rapidamente removidos pelo baço, e também porque reticulócitos são seletivamente sequestrados no baço. Retirado o baço, essas células sobrevivem na circulação.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui as demais causas de anemia hemolítica congênita não esferocítica (ver a seguir).

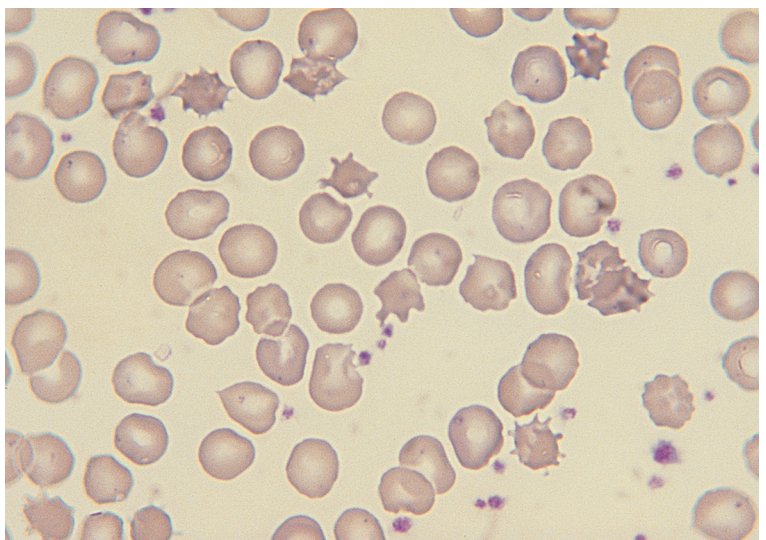


FIGURA 8.59 Distensão sanguínea pós-esplenectomia de paciente com deficiência da piruvatoquinase, mostrando macrocitose e acantocitose.

Exames adicionais

A deficiência de piruvatoquinase caracteriza-se por sinais de hemólise, como aumento de bilirrubina não conjugada (indireta) e de lactado-desidrogenase (LDH). Em alguns casos, há hemólise intravascular, causando baixa da haptoglobina sérica e hemosiderinúria. A fragilidade osmótica é normal em três quartos e reduzida em um quarto dos casos [185]. O aumento da auto-hemólise é visto somente em um quinto dos pacientes, portanto não é um teste útil [185]. O diagnóstico definitivo exige dosagem de piruvatoquinase.

Anemias hemolíticas não esferocíticas congênicas resultantes de outras deficiências enzimáticas do eritrócito

Uma variedade de anemias hemolíticas hereditárias, resultantes de deficiências enzimáticas específicas do eritrócito, não apresenta qualquer anormalidade característica do formato eritrocitário e é agrupada sob a designação conjunta de “anemias hemolíticas não esferocíticas congênicas”. Podem mostrar equinócitos e, nos defeitos na síntese do glutatião, células irregularmente contraídas.

As mais frequentes são as deficiências de piruvatoquinase e de G6PD, discutidas nos itens precedentes. Todas as demais são raras ou raríssimas. Deve-se suspeitar desse tipo de anemia quando há icterícia neonatal associada à hemólise ou hemólise crônica em crianças ou adultos. Icterícia neonatal, que é principalmente de origem hepática, é comum sobretudo na deficiência de G6PD. O defeito subjacente pode estar em enzimas (i) da via glicolítica, (ii) do *shunt* da pentose e da síntese ou do metabolismo do glutatião, ou (iii) do metabolismo dos nucleotídios. A genética e os aspectos clínicos associados desses defeitos estão resumidos nas Tabelas 8.5 a 8.7. Além desses, há suspeita ainda não seguramente comprovada da existência de uma associação de anemia hemolítica com deficiência de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [186].

Deficiências de uma mesma enzima são heterogêneas; as mutações diferem, ocorrendo em uma variedade de grupos étnicos dispersos em amplas áreas geográficas. A maioria das deficiências enzimáticas mostra herança autossômica recessiva, sendo os indivíduos afetados homozigotos ou, mais frequentemente, heterozigotos compostos.

TABELA 8.5 Características clínicas e genéticas das deficiências enzimáticas da via glicolítica; a maioria delas causa anemia hemolítica não esferocítica congênita [101, 186, 190-204]

Enzima	Frequência	Herança	Características associadas
Hexoquinase [196, 197]	Rara; ao menos 17 famílias conhecidas	AR* Gene <i>HK1</i> em 10q22.1; ao menos 7 mutações conhecidas	Múltiplas anomalias congênicas, diabetes melito latente ou retardo psicomotor em alguns casos; leucomalácia periventricular intrauterina relatada em um heterozigoto composto e um homozigoto com anemia hemolítica letal
Glicosefosfato-isomerase [198]	Terceira deficiência enzimática mais comum causadora de anemia brancos; 50 famílias conhecidas em caucasoides, afro-americanos, turcos, japoneses e judeus	AR Gene <i>GPI</i> em 19q13.11; ao menos 29 mutações conhecidas	Cinco mutações foram associadas a alterações não hematológicas, incluindo miopatia, retardo mental, sintomas neurológicos e disfunção granulocítica
Fosfofrutoquinase [†] [195, 199]	Rara; ao menos 39 famílias conhecidas em brancos, japoneses e judeus (um terço das famílias com mutações <i>PFKM</i> é judias)	AR Mutação no gene <i>PFKM</i> em 12q13 (ao menos 15 conhecidas) ou no gene <i>PFKL</i> em 21q22.3	Miopatia (doença de armazenamento de glicogênio tipo VII) em metade dos casos (os que têm mutação no gene <i>PFKM</i>); pode ocorrer miopatia sem hemólise; alguns indivíduos são assintomáticos
Aldolase [195, 200, 201]	Muito rara; ao menos 6 casos em 5 famílias	AR Mutações no gene <i>ALDOA</i> em 16q22-23	Retardo mental, múltiplas anomalias congênicas, doença de armazenamento de glicogênio tipo VI em 1 família; miopatia em dois casos (pode ocorrer rabdomiólise)

(continua)

TABELA 8.5 Características clínicas e genéticas das deficiências enzimáticas da via glicolítica; a maioria delas causa anemia hemolítica não esferocítica congênita [101, 186, 190-204] (*Continuação*)

Enzima	Frequência	Herança	Características associadas
Triosefosfato-isomerase [195, 202, 203]	Rara; ao menos 35 casos conhecidos; heterozigose; contudo, é inesperadamente comum em afro-americanos	AR Ao menos 14 mutações conhecidas no gene <i>TPI1</i> em 12p13	Disfunção neuromuscular e cardíaca progressiva na grande maioria dos casos; às vezes, retardo mental; suscetibilidade a infecções; morte <i>in utero</i> ou na primeira infância
Fosfogliceratoquinase [195, 199]	Rara; ao menos 29 famílias conhecidas	Recessiva ligada ao sexo Gene <i>PGK1</i> em Xq21.1; ao menos 17 variantes conhecidas; mulheres heterozigóticas podem ter leve anemia hemolítica	Nenhum defeito associado ou várias combinações de miopatia com rabdomiólise induzida por exercício, retardo de crescimento, retardo mental e disfunção neurológica progressiva; miopatia, disfunção neurológica ou ambas podem ocorrer sem hemólise
2,3-Difosfoglicerato-mutase [195] [†]	Rara; cerca de 20 casos conhecidos	AR Gene <i>BPGM</i> em 7q33	Nessas famílias, é notada metade da atividade normal de enolase em pacientes com esferocitose hereditária com herança AD
Enolase [195]	Muito rara; 3 famílias conhecidas com deficiência e hemólise, mas pode não haver relação causal	AD? Gene <i>ENO1</i> em 1q36.23, mas sem identificação das mutações	
Piruvatoquinase [195, 204]	Frequência similar à da deficiência de G6PD como causa de anemia hemolítica crônica; prevalência em brancos de 50/milhão, mais de 500 casos descritos	AR Gene <i>PKLR</i> em 1q22; mais de 160 mutações conhecidas	
Lactato-desidrogenase [§] [195]	Muito rara	AR Gene <i>LDHA</i> em 11p15.1 ou gene <i>LDHB</i> em 12p12.1	

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; G6PD, glicose-6-fosfato-desidrogenase.

*AD em duas famílias com características morfológicas incomuns.

[†]Pode associar-se a anemia hemolítica, hemólise compensada ou leve poliglobulia.

[‡]Causa poliglobulia em vez de anemia, pela baixa de 2,3-DPG; foi descrita hemólise compensada, mas uma relação causal não foi comprovada [186].

[§]Redução da enzima, mas sem anemia (embora hemólise seja notada em camundongos deficientes) [186].

TABELA 8.6 Características clínicas e genéticas das deficiências ou excessos de enzimas envolvidas no metabolismo dos nucleotídeos; a maioria delas causa anemia hemolítica não esferocítica congênita [101, 186, 192-194, 205-210]

Enzima	Frequência	Herança	Características associadas
Adenilatoquinase* [195, 205, 206]	Rara	AR Gene <i>AK1</i> em 9q34.11; ao menos 7 mutações conhecidas	Retardo mental em alguns pacientes
Pirimidina-5'-nucleotidase [37, 207-209]	Rara; cerca de 64 casos conhecidos em 54 famílias	AR <i>NT5C3A</i> em 7p14.3 [208]	Possível associação com dificuldade de aprendizado, vista em 7 casos [208, 209]
Excesso de adenosina desaminase [†]	Rara	AD Gene <i>ADA</i> em 20q13.2, possível tradução aumentada de mRNA	[210]

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva.

*Associação inconsistente com anemia [186].

[†]Deficiência causa imunodeficiência, mas não anemia.

TABELA 8.7 Características clínicas e genéticas das deficiências de enzimas do *shunt* hexose-monofosfato e de enzimas correlacionadas à síntese e ao metabolismo do glutatião, que podem causar anemia hemolítica não esferocítica congênita [101, 192-195, 211-217]

Enzima	Frequência	Herança	Características associadas
Glicose-6-fosfato desidrogenase [211]	Frequência similar à deficiência de piruvatoquinase como causa de anemia hemolítica crônica; ocorre esporadicamente em muitos grupos étnicos	Ligada ao sexo, gene <i>G6PD</i> em Xq28	Icterícia neonatal
γ-Glutamil cisteína-sintetase* [212, 213]	Rara; brancos, japoneses, marroquinos e mestiços brancos/índios americanos	AR Mutações descritas no gene <i>GCLC</i> em 6p12.1	Doença espinocerebelar ou neuropatia e retardo mental em 4 de 9 pacientes descritos, aminoacidúria em 2
Glutatião-sintetase [214, 215]	Rara	AR Gene <i>GSS</i> em 20q11.2	Retardo mental, ataxia e acidose metabólica com 5-oxoprolinúria em alguns casos com deficiência generalizada (não restrita aos eritrócitos); pode haver neutropenia intermitente [161]
Glutatião-peroxidase [195, 216]	Rara; ingleses, poloneses, sírios, judeus, mediterrâneos, negros	Autossômica <i>GPX1</i> em 3p21.31	Icterícia neonatal e hemólise induzida por drogas em heterozigotos, hemólise compensada em homozigotos
Glutatião-redutase† [195, 217]	Rara	AR Gene <i>GSR</i> em 8p12	Cataratas, favismo, icterícia neonatal não causada por hemólise

AR, autossômica recessiva.

*Enzima requerida para a síntese do glutatião.

†Enzima que favorece a manutenção do glutatião em estado reduzido; a deficiência adquirida, causada principalmente por deficiência de riboflavina, tem sido associada a hemólise, pan-mielopatia e um distúrbio neurológico.

Constituem exceções as deficiências de fosfogliceroquinase e de G6PD, cuja herança é recessiva ligada ao sexo, a deficiência de enolase, provavelmente autossômica dominante, e a raríssima anemia hemolítica associada ao excesso de adenosina desaminase, que é autossômica dominante. Indivíduos heterozigóticos não sofrem hemólise, com exceção de algumas mulheres heterozigóticas para a deficiência de fosfogliceroquinase [193]. A anemia pode agravar-se com infecções intercorrentes e com a gravidez. Em defeitos do *shunt* da pentose ou da síntese de glutatião, a hemólise pode agravar-se por infecção, drogas ou ingestão de favas [214]. Agravamento súbito da anemia também pode decorrer de aplasia eritroide pura, causada por parvovírus B19. Pode haver armazenamento excessivo de ferro, principalmente em pacientes heterozigóticos para hemocromatose familiar. Em uma família com deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase, havia hemólise intravascular causando deficiência de ferro pela hemoglobinúria [208].

Deve-se notar que deficiências de enzimas do começo da via glicolítica provocam redução da síntese de 2,3-DPG, o que, por sua vez, desviando a curva de dissociação do oxigênio para a esquerda, agrava os sintomas de anemia e causa estímulo hipóxico à eritropoese. Isso pode, paradoxalmente, causar poliglobulia, como já foi descrito em pacientes com deficiência de difosfogliceratomutase e em alguns pacientes com deficiência de fosfofrutoquinase. Deficiências de enzimas tardias na via glicolítica, pelo contrário, associam-se a nível alto de 2,3-DPG e sintomatologia mais leve do que a esperada para o nível de hemoglobina.

Hemograma

Há hemólise compensada ou anemia crônica, de leve a severa. A distensão sanguínea (ver Figura 8.57) geralmente mostra achados inespecíficos, como anisocitose, macrocitose, policromatocitose e pontilhado basófilo. Às vezes, há equinócitos [190] ou outros picilócitos, em pequeno número.

Foram observados equinócitos em alguns casos de deficiência de triosefosfato-isomerase (Figura 8.60) [218], de aldolase [219], de fosfogliceratoquinase [220] e glicose (fosfato-isomerase [Figura 8.61]). Observou-se pequeno número de eritrócitos irregularmente contraídos na deficiência de triosefosfato isomerase [221] e de estomatócitos na deficiência de glicosefosfato isomerase [222]. Eritrócitos irregularmente contraídos também são vistos nos defeitos na biossíntese de glutatíão, e são proeminentes durante episódios de hemólise aguda (Figura 8.62).

A deficiência de adenilatoquinase associa-se a pequeno número de eliptócitos, esferócitos,

esquizócitos e estomatócitos [223, 224]. A deficiência de glutatíão-sintetase associa-se com pecilócitos em lágrima [214]. Em uma família com deficiência de 2,3-difosfoglicerato-mutase foram notados ocasionais microesferócitos [225]. A deficiência de enolase tem uma característica peculiar: em 3 famílias, mostrou-se associada à presença de esferócitos [193, 195]; apesar de “esferocítica”, por conveniência é discutida aqui com as demais deficiências enzimáticas, “não esferocíticas”. A distensão sanguínea só é característica na deficiência de pirimidina 5'-nucleotidase pela presença de um pontilhado basófilo proeminente (Figura 8.63); este é mais facilmente

FIGURA 8.60 Distensão sanguínea de paciente com deficiência de triosefosfato-isomerase mostrando equinocitose. Cortesia do Dr. Joan Luis Vives Corrons.

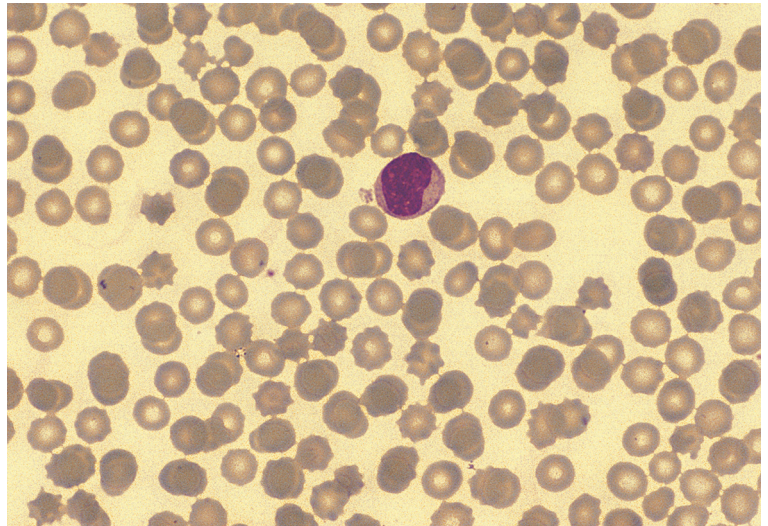
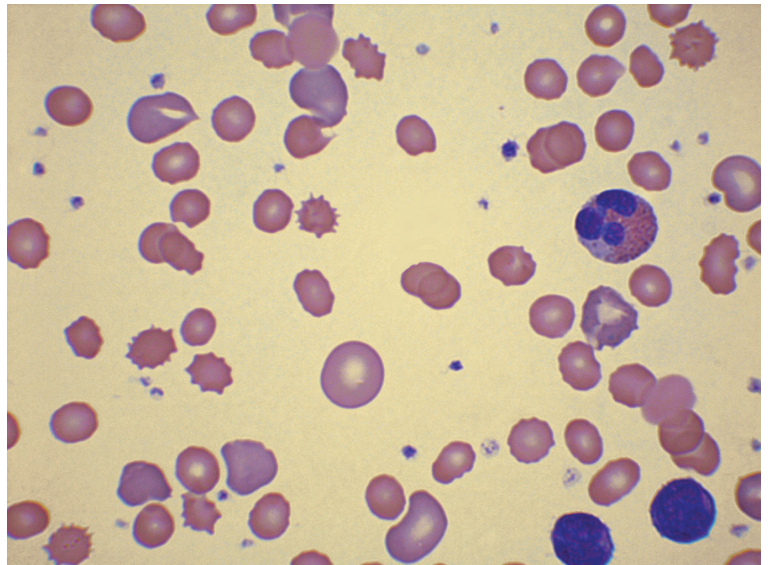


FIGURA 8.61 Distensão sanguínea de paciente com deficiência de glicosefosfato-isomerase, mostrando equinocitose e macrócitos policromáticos.



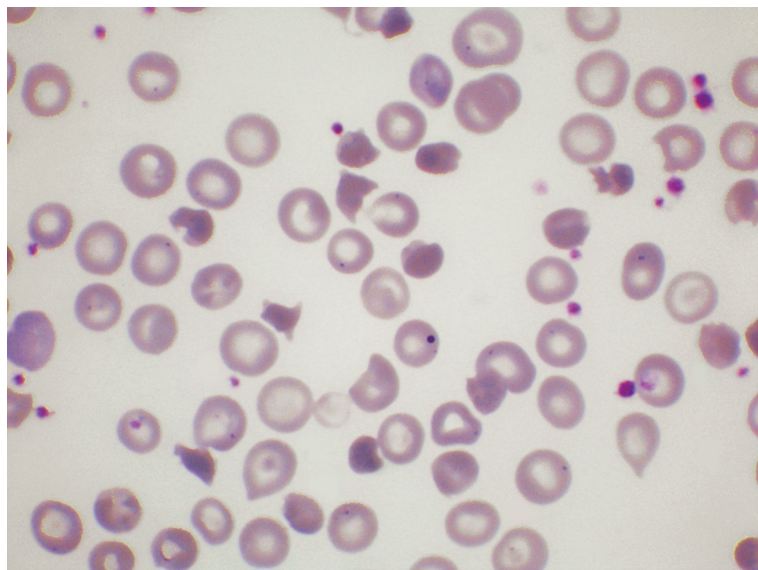


FIGURA 8.62 Distensão sanguínea de paciente com deficiência de glutatião-peroxidase durante episódio hemolítico agudo, mostrando eritrócitos irregularmente contraídos, policromatofilia e um eritrócito com corpo de Howell-Jolly; este é atribuído a hipoesplenismo por sobrecarga durante a hemólise aguda. Cortesia do Dr. Mark Layton.

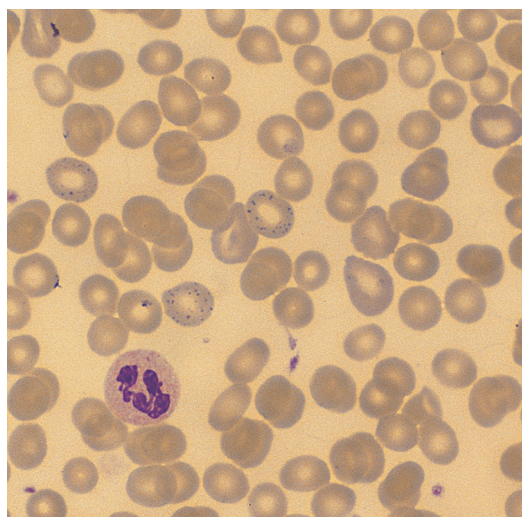


FIGURA 8.63 Distensão sanguínea de paciente com deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase, mostrando pontilhado basófilo proeminente. Cortesia do Dr. Joan Luis Vives Corrons.

observado em distensões sanguíneas feitas com sangue heparinizado ou não anticoagulado (nativo) do que com sangue anticoagulado (EDTA); em sangue estocado em EDTA por mais de 4 horas, o pontilhado não se forma [37]. Além do pontilhado basófilo, é comum haver uma pequena porcentagem de esferócitos ou eritrócitos espiculados, mas o teste de feagilidade osmótica costuma ser normal [207]. A contagem de reticulócitos está aumentada. Em alguns casos, há leucopenia por hiperesplenismo.

Após esplenectomia, a hemoglobina em geral aumenta 1-3 g/dL; VCM e HCM também podem aumentar. Se houver má resposta à esplenectomia, pode desenvolver-se acentuada trombocitose. Em um estudo de 6 casos não relacionados [207], a esplenectomia não se mostrou útil.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da deficiência de piruvatoquinase e das demais deficiências enzimáticas inclui (i) anemias hemolíticas congênitas devidas a anormalidades da membrana, acompanhadas apenas de alterações morfológicas discretas, como a xerocitose congênita e alguns casos de estomatocitose congênita, (ii) algumas porfirias, e (iii) intoxicação por chumbo. A porfiria eritropoética congênita causa hemólise crônica, com ou sem anemia; a distensão sanguínea nessa condição mostra anisocitose, pecilocitose, pontilhado basófilo e policromatocitose [226]; às vezes, corpos de Howell-Jolly. Finos cristais violeta-purpúreos, geralmente com disposição radial, foram descritos em eritrócitos (ver Figura 3.63); é provável que representem porfirinas cristalizadas [227]. Hiperesplenismo é uma complicação comum, causando leucopenia e trombocitopenia [226]. Um caso da raríssima harderoporfiria mostrou pontilhado basófilo [228], mas, em geral, casos de porfiria com hemólise não mostram aspectos morfológicos específicos. O diagnóstico diferencial da deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase inclui particularmente a anemia hemolítica devida à intoxicação por chumbo, que causa deficiência

adquirida da mesma enzima e, consequentemente, pontilhado basófilo proeminente. Em casos que se apresentam após o período neonatal, o diagnóstico diferencial também inclui a doença de Wilson, a porfiria eritropoética congênita e as anemias hemolíticas adquiridas. A doença de Wilson pode causar hemólise aguda com anormalidades morfológicas mínimas antes de qualquer evidência óbvia de doença hepática.

Exames adicionais

As anemias hemolíticas não esferocíticas congênicas caracterizam-se por sinais de hemólise, como aumento da bilirrubina não conjugada (indireta). Em alguns casos, há hemólise intravascular, com baixa da haptoglobina e hemossiderinúria. A demonstração de fragilidade osmótica normal, com ou sem auto-hemólise aumentada, é compatível com deficiência enzimática eritrocitária. O diagnóstico definitivo, porém, requer dosagens bioquímicas que geralmente só podem ser feitas em laboratórios de referência. A porfiria eritropoética congênita pode ser confirmada pela demonstração de fluorescência em uma proporção dos eritrócitos e no núcleo de eritroblastos circulantes, se houver, quando o sangue é examinado sob luz ultravioleta.

Anemias hemolíticas adquiridas

Anemias hemolíticas adquiridas com mecanismo imunológico

Anemia hemolítica autoimune com anticorpos quentes

A maioria dos casos de anemia hemolítica autoimune (AHAI) é causada por anticorpos que agem a quente, em geral do tipo IgG, dirigidos contra antígenos da membrana eritrocitária. As células fagocíticas do baço e, em menor grau, do fígado, removem tanto eritrócitos inteiros como partes da membrana onde se ligaram imunoglobulinas ou complemento. A remoção de pedaços de membrana leva à formação de esferócitos. A AHAI pode ser primária, pode ser parte do quadro de uma doença autoimune mais ampla, como o lúpus eritematoso sistêmico e a síndrome linfoproliferativa autoimune, e pode ser secundária a outras doenças, como leucemia linfocítica crônica (LLC), linfomas (inclusive de Hodgkin), carcinoma de ovário e síndrome de DiGeorge; em um estudo, em 3 de 13 casos de AHAI ou síndrome de Evans (AHAI mais púrpura trombocitopênica autoimune), havia uma população de linfócito periféricos com o fenótipo de LLC,

sugerindo que linfocitose monoclonal B predispõe a AHAI [229]. Raramente, pode ser induzida por um fármaco – no passado, geralmente α -metildopa (atualmente em desuso), mas, ocasionalmente, levodopa, ácido mefenâmico, interferon- α [230] ou outros. Um caso foi descrito em associação com infecção por um microrganismo provisoriamente denominado *Candidatus Mycoplasma haemohominis* [231]. AHAI pode surgir como decorrência da síndrome de Wiskott-Aldrich; quando ocorre, é sinal de prognóstico adverso e indicação para transplante [232]. Pode ocorrer AHAI com anticorpos quentes em receptores recentes de transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas e de transplantes de órgãos sólidos, como decorrência de desarranjo de respostas imunológicas celulares. No caso de transplantes de células-tronco, há anticorpos do doador contra eritrócitos derivados do doador; no caso de transplantes de órgãos sólidos há anticorpos do receptor contra eritrócitos do receptor [233].

Hemograma

A distensão sanguínea (Figura 8.64) mostra esferocitose, policromatofilia e macrócitos policromáticos. Pode haver eritrofagocitose por neutrófilos e monócitos, mas essas células em fagocitose são incomuns, só sendo vistas com facilidade em preparações de concentrado de leucócitos (*buffy coat*). Em casos severos, podem estar presentes precursores granulocíticos e eritroblastos, e podem ser notados sinais de hipoesplenismo, decorrentes de sobrecarga

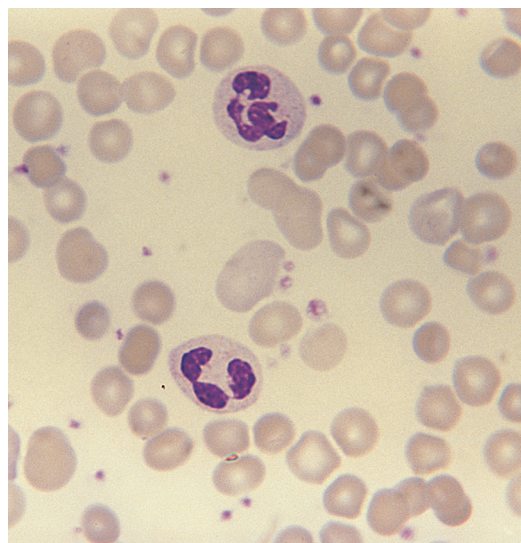
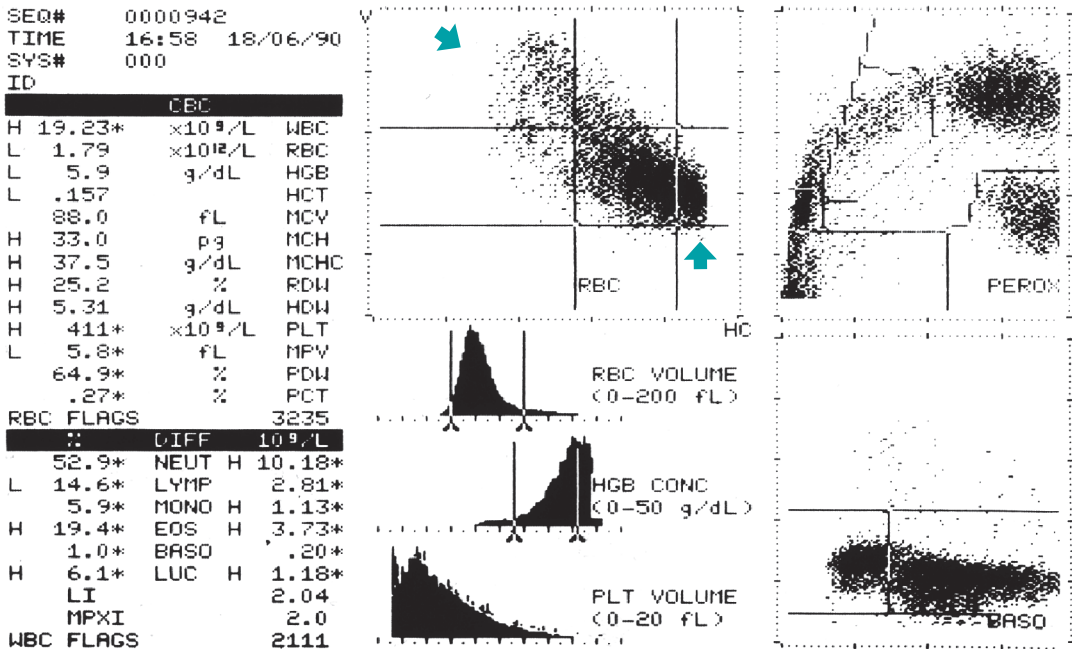


FIGURA 8.64 Distensão sanguínea de paciente com anemia hemolítica autoimune, mostrando esferócitos e macrócitos policromáticos.



por semanas [236], de modo que a confusão com AHAI é possível. Reações transfusionais imediatas não costumam ser confundidas com AHAI, pois a maioria dos eritrócitos é imediatamente destruída e a esferocitose não é proeminente.

A anemia hemolítica crônica mediada por crioaglutininas (ver a seguir) costuma ser facilmente distinguida da AHAI com anticorpos quentes ao exame da distensão sanguínea; os casos agudos prestam-se mais à confusão, mas podem ser distintos, porque, no caso de crioaglutininas, os aglutinados de eritrócitos são mais proeminentes e os esferócitos não são tão numerosos quanto na AHAI com anticorpos quentes.

A hemoglobinúria paroxística a frio e as anemias hemolíticas imunológicas induzidas por fármacos (ver a seguir) podem causar confusão, já que alguns esferócitos estão presentes, mas a história clínica deve sugerir o diagnóstico correto.

Exames adicionais

Um teste de antiglobulina direto (teste de Coombs) positivo é crucial para distinguir a AHAI da esferocitose hereditária. Pode, também, haver anticorpos livres no plasma, detectados pelo teste de antiglobulina indireto. O teste é positivo em algum momento da evolução, não necessariamente sempre, em 99% dos pacientes. Um resultado negativo pode dever-se ao anticorpo ser IgA ou IgM, ou à baixa afinidade do anticorpo IgG causal [237]. Alguns pacientes possuem outros autoanticorpos, como anti-DNA ou fator antinuclear. O teste de fragilidade osmótica é positivo tanto na esferocitose hereditária como na AHAI, por isso não serve para a diferenciação entre as duas condições; a ligação de EMA, contudo, é negativa na AHAI, de modo que se presta ao diagnóstico diferencial. Em crianças, síndrome de Evans pode ser o aspecto de apresentação da síndrome linfoproliferativa autoimune e, por essa razão, sempre é indicada a imunofenotipagem para detecção de linfócitos simultaneamente negativos para CD4 e CD8 [238].

Anemia hemolítica induzida por crioaglutininas

Autoanticorpos com ótimo térmico em baixas temperaturas ainda assim podem induzir hemólise; crioaglutininas usualmente são anticorpos IgM, os quais podem causar tanto aglutinação dos eritrócitos como hemólise mediada por complemento. Podem decorrer, ou predominar, aspectos clínicos tanto da hemólise como da aglutinação dos

eritrócitos nos pequenos vasos periféricos após exposição ao frio. A produção de crioaglutinina pode ser um fenômeno súbito, como no caso dos anticorpos policlonais produzidos após infecções, como mononucleose infecciosa, infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, rubéola, varicela, citomegalovirose, infecção por HIV, pneumonia dos Legionários [239] ou brucelose [240]. Nesses casos, hemólise aguda é a característica clínica dominante. A produção de anticorpos frios também pode ser crônica, quando um clone de linfócitos neoplásicos produz uma crioaglutinina monoclonal, sendo a síndrome conhecida como doença de crioaglutininas. As características clínicas dominantes são cianose periférica (acrocianose) e isquemia após exposição ao frio, mas também podem estar presentes certo grau de hemólise e aspectos sugestivos de doença linfoproliferativa, como linfonodopatias.

Crioaglutininas produzidas após infecções como o sarampo e outras viroses são igualmente passíveis de causar uma síndrome clínica à parte, conhecida como hemoglobinúria paroxística a frio (ver a seguir).

Hemograma

Na anemia hemolítica aguda induzida por crioaglutininas, o sangue periférico (Figura 8.66) mostra conglomerados de eritrócitos, número variável de esferócitos e, subsequentemente, policromatofilia e macrócitos policromáticos. Ocasionalmente, pode ser vista eritrofagocitose. Quando a hemólise é decorrente de mononucleose infecciosa e, com menos frequência, de outras viroses, há um número variável de linfócitos atípicos. Na doença crônica de crioaglutininas, a característica dominante no sangue periférico é a aglutinação dos eritrócitos, a qual pode ser intensa (ver Figura 3.2). Alguns casos apresentam também linfocitose, e podem estar presentes linfócitos plasmocitoides. A primeira suspeita da presença de uma crioaglutinina provém das contagens automatizadas, já que os conglomerados de eritrócitos provocam uma elevação espúria no VCM, na HCM e na CHCM quando obtidos com contadores de impedância, como os modelos Coulter e, em menor grau, com os contadores de dispersão da luz, como a série Siemens H.I e Advia. Histogramas e citogramas podem mostrar duas populações de eritrócitos, sendo os aparentes macrócitos conglomerados de eritrócitos. A presença de crioaglutinina é facilmente comprovada aquecendo a amostra de sangue e repetindo as contagens automatizadas.

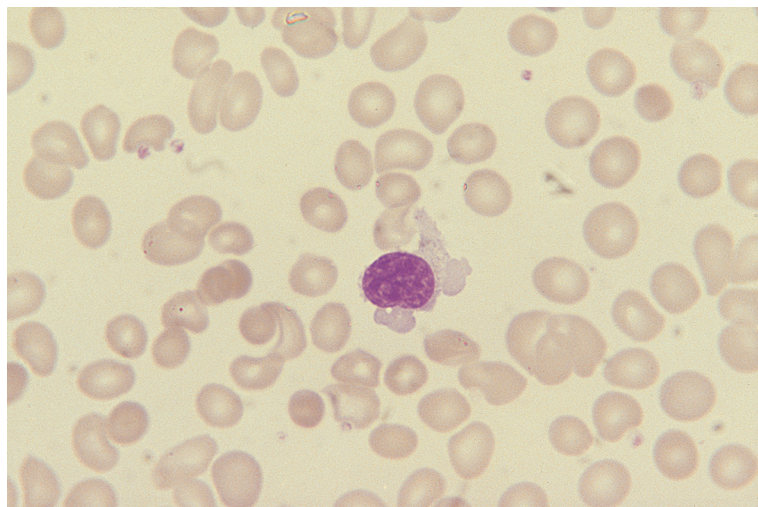


FIGURA 8.66 Distensão sanguínea de paciente com anemia hemolítica aguda causada por crioaglutinina anti-i, que surgiu como complicação de mononucleose infecciosa. Há alguns esferócitos, um pequeno aglutinado de eritrócitos e um linfócito atípico.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as outras causas de hemólise aguda, esferocitose e aglutinação dos eritrócitos. Os aspectos na hemoglobinúria paroxística a frio são muito semelhantes e fáceis de confundir.

Exames adicionais

A confirmação de que hemólise ou isquemia sejam causadas por crioaglutinina é feita pelo teste de antiglobulina direto, positivo com o soro anticomplemento mas não com o soro anti-IgG, e pela detecção da própria crioaglutinina, a qual, geralmente, é IgM, na maioria das vezes com especificidade anti-I e, na minoria, com especificidade anti-i ou de outro tipo. Nas infecções por *Mycoplasma*, é mais comum a especificidade anti-I e, na mononucleose infecciosa, a anti-i. Crioaglutininas não são raras em indivíduos saudáveis, mas em pacientes com sinais clínicos significativos estão presentes em título elevado e/ou apresentam grande amplitude térmica.

Hemoglobinúria paroxística a frio

Esse termo corresponde a duas síndromes distintas, ambas causadas por um anticorpo bifásico, designado anticorpo de Donath-Landsteiner. É bifásico o anticorpo que se liga aos eritrócitos a baixa temperatura mas causa potente ativação do complemento ao aquecimento a 37°C; é em geral IgG, com especificidade anti-P. Nos casos crônicos, há hemólise episódica, da qual vem a designação “paroxística”. Nos casos agudos, há apenas um episódio de hemólise, e o termo “hemoglobinúria

paroxística a frio” (HPF), embora inapropriado, está consagrado pelo uso. A HPF crônica, muito rara, pode ser idiopática ou secundária à sífilis ou a outras infecções. Raramente, decorre de linfomas, com o anticorpo secretado pelas células linfomatosas [241]. HPF aguda transiente geralmente segue uma doença febril inespecífica mas pode também seguir infecções específicas, bacterianas ou virais, como sarampo, caxumba, varicela, citomegalovirose, mononucleose infecciosa, infecções por *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Klebsiella pneumoniae* [239]. Como a hemólise é intravascular, há hemoglobinúria.

Hemograma

Na HPF transiente aguda, há redução de E, Hb e Hct, às vezes com anemia severa. A contagem de reticulócitos geralmente aumenta, mas, às vezes, há reticulocitopenia [239]. Há pequenos aglutinados de eritrócitos e esferócitos (Figura 8.67). Eritrofagocitose por neutrófilos pode ser proeminente (Figura 8.68), e também são vistos enormes vacúolos em neutrófilos [242]. Na HPF crônica, não há aspectos característicos. Pode ocorrer formação de rosetas ao redor de neutrófilos [243]. A HPF pode acompanhar-se de leucopenia, por neutropenia, eosinopenia, monocitopenia e, de modo menos significativo, de linfopenia; mas também pode haver neutrofilia e desvio à esquerda [239, 244]. As plaquetas estão normais ou aumentadas.

Exames adicionais

O diagnóstico de HPF é confirmado pela demonstração do anticorpo de Donath-Landsteiner, geralmente

FIGURA 8.67 Distensão sanguínea em caso de hemoglobinúria paroxística a frio mostrando esferocitose e aglutinação dos eritrócitos.

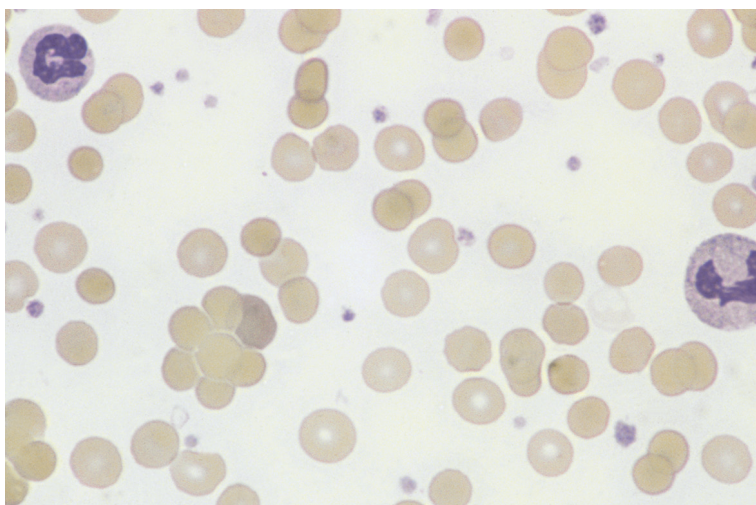
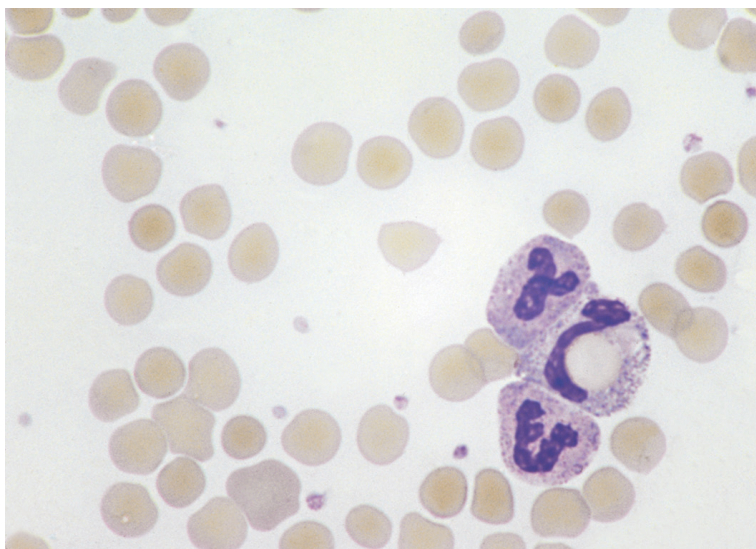


FIGURA 8.68 Distensão sanguínea em caso de hemoglobinúria paroxística a frio (mesmo caso da Figura 8.67), mostrando eritrofagocitose.



anti-P, que causa uma hemólise bifásica, isto é, ao reaquecer a amostra de sangue previamente resfriada a 5°C.

Anemia hemolítica autoimune combinada, com anticorpos frios e quentes

Há raros pacientes que apresentam os critérios sorológicos para anemia hemolítica com anticorpos quentes e também têm uma aglutinina fria de grande amplitude térmica [239]. A hemólise costuma ser severa mas responsiva a corticoide; a cronicidade é a regra. Correlaciona-se com lúpus eritematoso sistêmico e linfoma [245].

Anemia hemolítica imunológica induzida por fármacos e outros antígenos exógenos

Fármacos são agora uma causa rara, mas ainda importante, de anemia hemolítica. São produzidos anticorpos que lesam os eritrócitos apenas na presença do fármaco. A hemólise é aguda e intensa quando o eritrócito é um “espectador inocente”, lesado pelos complexos fármaco-anticorpo. Os fármacos causais atualmente mais frequentes de hemólise com essa patogênese são as cefalosporinas de terceira geração, em especial cefotetana e ceftriaxona [246]. Quando o anticorpo se dirige a um fármaco ligado à membrana eritrocitária

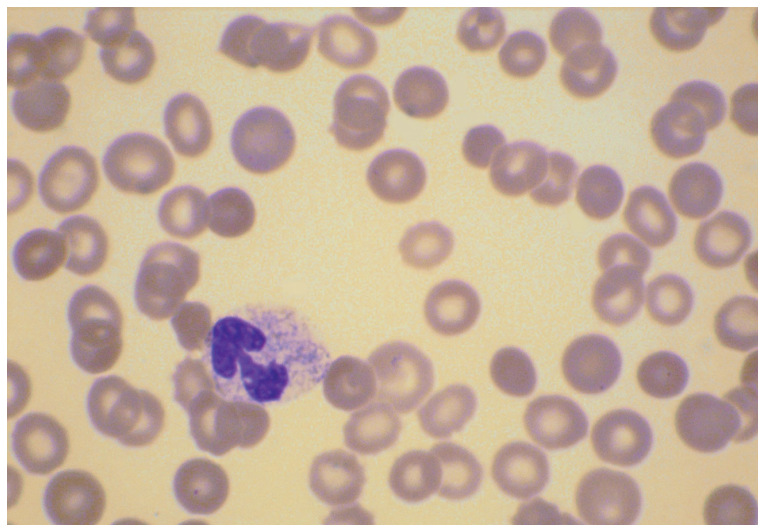


FIGURA 8.69 Distensão sanguínea de caso de anemia hemolítica imunológica induzida por cefalosporina, mostrando número moderado de esferócitos.

(“mecanismo de hapteno”), como na hemólise induzida por penicilina, a hemólise geralmente não é tão súbita e é menos intensa.

Anemia hemolítica imunológica pode ser induzida não só por fármacos, mas também pela exposição a outros antígenos exógenos, como pólenes e plantas contendo flavonoides [247].

Hemograma

Na hemólise induzida por fármacos do tipo “espectador inocente”, o hemograma mostra apenas anemia; esferócitos, como regra, são raros, mas podem ser mais numerosos (Figura 8.69). Na anemia hemolítica induzida por penicilina, pode haver um número moderado de esferócitos.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as demais causas de hemólise aguda e de esferocitose.

Exames adicionais

A suspeita de hemólise induzida por fármacos pode ser confirmada sorologicamente. Na hemólise induzida por penicilina, o teste de antiglobulina direta é positivo na ausência do fármaco, pois as imunoglobulinas do soro do paciente ligam-se às células revestidas com penicilina. Quando há hemólise com o mecanismo de espectador inocente, o teste de antiglobulina é em geral positivo, já que há complemento ligado aos eritrócitos. As provas sorológicas que utilizam eritrócitos normais, soro do paciente e o fármaco causador da hemólise são positivas.

Doença hemolítica do feto e do recém-nascido

Aloanticorpos maternos IgG atravessam a placenta e anticorpos que tenham especificidade para antígenos presentes nos eritrócitos fetais podem causar hidropisia fetal e doença hemolítica do recém-nascido. A forma mais comum de doença hemolítica do recém-nascido é, atualmente, a causada por anticorpos anti-A ou anti-B; doença hemolítica ABO clinicamente significativa ocorre, no Reino Unido, em uma a cada 3 mil gestações. A doença hemolítica Rh do recém-nascido, causada por anticorpo anti-D (Rh_0) ou por outros anticorpos anti-Rh, é, hoje, a segunda causa mais comum. Às vezes, a doença hemolítica do recém-nascido é causada por anticorpos de outros sistemas, como o Kell.

Hemograma

A anemia varia de leve a grave. Na doença hemolítica ABO do recém-nascido, a distensão sanguínea mostra esferocitose proeminente (Figura 8.70), ao passo que na doença hemolítica Rh do recém-nascido o grau de esferocitose é bem menor (Figura 8.71). Há policromatofilia, macrócitos policromáticos e eritroblastos, às vezes em grande número, o que explica a designação alternativa “eritroblastose fetal”. Eritrofagia por monócitos às vezes é vista na doença hemolítica por Rh [248]. Também pode haver neutropenia, monocitopenia, linfopenia e trombocitopenia [249, 250]. A contagem de reticulócitos é elevada.

Na doença hemolítica Kell do recém-nascido, as evidências de resposta medular à anemia

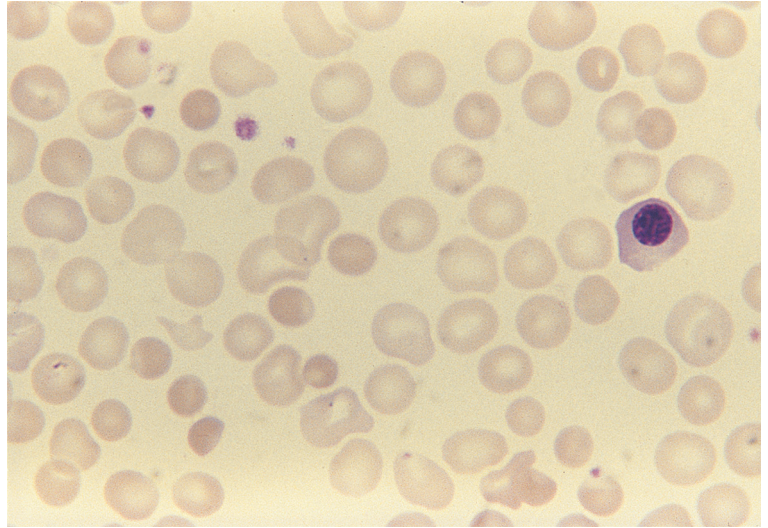


FIGURA 8.70 Distensão sanguínea em caso de doença hemolítica ABO do recém-nascido, mostrando pronunciada esferocitose e um eritroblasto.

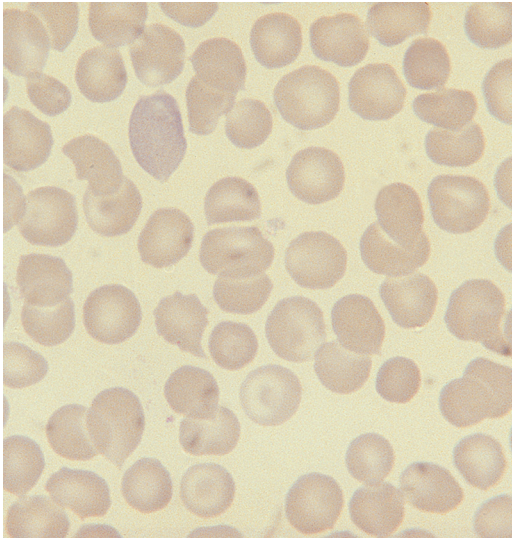


FIGURA 8.71 Distensão sanguínea em caso de doença hemolítica Rh do recém-nascido, mostrando que o grau de esferocitose é bem menor do que o observado na doença hemolítica ABO do recém-nascido (ver Figura 8.70).

(reticulocitose e eritroblastemia) não são apropriadas ao grau de anemia; há um componente de supressão medular [251], devido à agressão aos precursores eritroides pelos anticorpos anti-Kell [252]. Trombocitopenia acentuada também é um aspecto próprio da doença hemolítica Kell do recém-nascido e deve-se à inibição de proliferação de progenitores megacariocíticos por anticorpos Kell [252].

Diagnóstico diferencial

A principal diferenciação deve ser feita com a esferocitose hereditária.

Exames adicionais

O diagnóstico é confirmado pela positividade do teste de antiglobulina direta (teste de Coombs direto), no sangue do bebê, e pela detecção no soro materno de anticorpo IgG com especificidade contra um antígeno dos eritrócitos fetais. No caso de doença hemolítica ABO, deverá ser demonstrado um alto título do anticorpo IgG respectivo, em geral anti-A, raramente anti-B.

Outras anemias hemolíticas aloimunes

Além do período neonatal, a anemia hemolítica aloimune é um evento incomum. Reações transfusionais tardias após a transfusão de eritrócitos incompatíveis são de natureza aloimune, como também é aloimune a hemólise decorrente da infusão de plasma incompatível, de crioprecipitado, de imunoglobulina intravenosa em alta dose ou de outros produtos contendo imunoglobulina, como alguns concentrados de fatores VIII e IX. Hemólise aloimune pode resultar da administração de anti-D no tratamento de púrpura trombocitopênica autoimune [253]; podem ocorrer, raramente, hemoglobinemia e hemoglobinúria com queda súbita e significativa da hemoglobina. Hemólise imunológica transiente também pode ser secundária a transplante de medula óssea ABO incompatível, como em transplante de medula óssea de doador A ou B em receptor O;

deve-se a anticorpos anti-A ou anti-B pré-formados. Se for usado sangue periférico como fonte de células-tronco, pode ocorrer hemólise severa após transplante com incompatibilidade ABO do lado menor (i.e., doador O em receptor A ou B); presume-se decorrer do maior conteúdo de linfócitos do doador nesse tipo de transplante [254]. Quimerismo misto também pode causar hemólise aloimune pós-transplante, quando linfócitos sobreviventes do receptor produzem anticorpos contra eritrócitos derivados do doador.

Hemograma

Nas reações transfusionais tardias, somente os eritrócitos transfundidos tornam-se esferocíticos; os eritrócitos próprios do paciente permanecem normais ou com as alterações da doença subjacente. Nos demais tipos de anemia hemolítica aloimune, a esferocitose é generalizada.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outras causas de esferocitose com teste de antiglobulina direto positivo, especialmente anemia hemolítica autoimune e anemia hemolítica imunológica causada por fármacos.

Exames adicionais

O teste de antiglobulina direto (teste de Coombs direto) é positivo, como são também positivos os

testes indicativos de hemólise intravascular – hemoglobinemia e hemoglobinúria (se a hemólise for aguda e severa), teste de Schumm positivo, baixa da haptoglobina sérica e hemossiderinúria. A história clínica, por outro lado, é mais importante do que os exames de laboratório na elucidação da natureza da anemia. A hemólise aloimune pode ser severa a ponto de precipitar insuficiência renal aguda, por isso a necessidade de monitorar a função renal.

Hemólise na síndrome autoimune/linfoproliferativa familiar

Hemólise com teste antiglobulina positivística e diseritropoese associada têm sido descritas nessa síndrome, associada a mutações no gene *FAS* e diminuição da apoptose mediada por Fas [255].

Anemias hemolíticas adquiridas não imunológicas

Anemias hemolíticas microangiopáticas e outras anemias hemolíticas com esquizócitos

O termo anemia hemolítica microangiopática refere-se à anemia hemolítica causada por fragmentação eritrocitária resultante de dano endotelial, deposição de fibrina nos capilares ou ambos. As causas são múltiplas (Tabela 8.8). Na infância, a causa mais comum é a infecção intestinal, geralmente causada por *Escherichia coli* (sorótipo O157:H7) secretora

TABELA 8.8 Algumas causas de fragmentação eritrocitária

Anemia hemolítica microangiopática Congênita, hereditária e familiar
Púrpura trombocitopênica trombótica familiar resultante de deficiência da protease que cliva o fator von Willebrand (ADAMTS13) [256, 257]; síndrome hemolítico-urêmica familiar (algumas causadas pela deficiência hereditária autossômica recessiva do fator H do complemento [258] ou de outras proteínas reguladoras do complemento, como a proteína cofator da membrana e fator I [259]; deficiência de hemeoxigenase 1 [260]; associada com defeito congênito de cobalamina C [261])
Síndrome hemolítico-urêmica epidêmica ou esporádica, púrpura trombocitopênica trombótica e microangiopatias trombóticas correlatas Após infecção por <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> produtora de verotoxina, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Legionella pneumophila</i> [262], <i>Rickettsia rickettsii</i> [263], <i>Borrelia burgdorferi</i> [264], <i>Streptococcus pneumoniae</i> [265], <i>Aeromonas hydrophila</i> [266], <i>Campylobacter upsaliensis</i> [266], <i>Campylobacter canimorsus</i> [266], <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (endocardite bacteriana com vegetações, [267], brucelose [268], leptospirose [269], vírus (incluindo HIV, HTLV-1, CMV, varicela-zóster, adenovírus e, possivelmente, herpes-vírus humano 6 [270]), fungos [271-275] ou após vacinação (contra <i>influenza</i> , poliomielite, sarampo, varíola, antígeno tríplice ou tifoide-paratifoide) [276])
Associada à gravidez incluindo síndrome HELLP uso de anticoncepcionais orais ou puerpério
Toxicidade a fármacos e drogas* Quinina [278], mitomicina C, bleomicina, pentostatina [279], daunorrubicina [280], gencitabina [281], metil-CCNU [282], tamoxifeno [282], atorvastatina [282], penicilina, rifampicina [280], sulfonamidas [280], quinolonas [280], aciclovir [280], valaciclovir [280], penicilamina [272], ciclosporina, tacrolimo [283], sirolimo [207], sinvastatina [284], ticlopidina [285], clopidogrel [280, 286], risperidona [280], OKT3 [287], interferon β [196], interferon α no tratamento de LMC [288], heroína [266], medicação africana tradicional ("pitocina") [289], hipersensibilidade à quinina [290], arsênico [282], iodo [282], <i>crack cocaína</i> [282], imunotoxina recombinante anti-CD22 [291], ácido all- <i>trans</i> -retinoico no tratamento de leucemia promielocítica aguda [927], bevacizumabe [293], abuso de oximorfona pelo uso intravenoso de tabletes de absorção lenta [294]

(continua)

TABELA 8.8 (Continuação) Algumas causas de fragmentação eritrocitária

Outros processos patológicos envolvendo pequenos vasos renais (com ou sem lesões vasculares extrarrenais)
Hipertensão associada à gravidez
Hipertensão maligna
Necrose cortical renal
Poliarterite nodosa microscópica
Glomerulonefrite aguda
Envolvimento renal no lúpus eritematoso sistêmico (pode preceder outras manifestações da doença) [295]
Envolvimento renal na esclerose sistêmica (esclerodermia) [296]
Granulomatose com poliangiite (granulomatose de Wegener)
Irradiação renal
Rejeição de rim transplantado
Síndrome POEMS [281]
Síndrome antifosfolípido [281]
Disfibrinogenemia e outros estados trombofílicos [281]
Angiopatia diabética [297]
Após transplante de células-tronco hematopoéticas
Associada com pancreatite [298]
Amiloidose sistêmica
Doença de depósito de cadeias leves (1 caso) [299]
Oxalose secundária (1 caso) [300]
Coagulação intravascular disseminada (incluindo a associada doenças malignas, a aneurisma aórtico, trombose da veia renal e picada de ofídio)
Desfibrinação terapêutica (ocasionalmente)
Mixoma atrial [301]
Carcinoma disseminado (particularmente secretor de mucina, sobretudo o carcinoma de estômago)
Após arteriografia [302]
Reação a picada de abelha [272]
Transplante de medula óssea
Associada a timoma (1 caso) [303]
Associada a malformações vasculares e outras lesões valvulares e de grandes vasos
Hemangioma
Hemangioendotelioma do fígado ou baço
Hemangioendoteliossarcoma
Lesões pulmonares plexiformes da hipertensão pulmonar
Lesões pulmonares plexiformes da cirrose [304]
Arterite de células gigantes [305]
Variz da veia umbilical (em 1 feto) [306]
Próteses valvulares (a aórtica mais do que a mitral, bem mais comum quando há regurgitação ao redor da válvula)
Homoenxerto, xenoenxerto (válvula porcina) e de válvula de fásia lata autógena (menos provável do que no caso de válvulas protéticas)
Valvulite reumática aguda [307]
Retalhos protéticos, como os usados nos defeitos do septo ventricular
Fechamento endoluminal de patência do canal arterial [308]
Estenose aórtica severa (muito rara)
Doença valvular mitral severa e após valvuloplastia para doença valvular mitral (rara)
Mixoma cardíaco
Coarctação da aorta (rara)
Uso de cateteres subclávios de diálise [309]
Associada a circulação extracorpórea (associada a trombose no aparelho) [309] e oxigenação longa por membrana extracorpórea em neonatos [310]

CMV; síndrome HELLP, hemólise, elevação de enzimas hepáticas, baixa contagem de plaquetas; síndrome POEMS, polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína M, alterações cutâneas.

*A microangiopatia trombótica induzida por drogas pode ser idiossincrásica (p. ex., por quinidina e ticlopidina) ou dose-dependente (como com agentes quimioterapêuticos citotóxicos) [277].

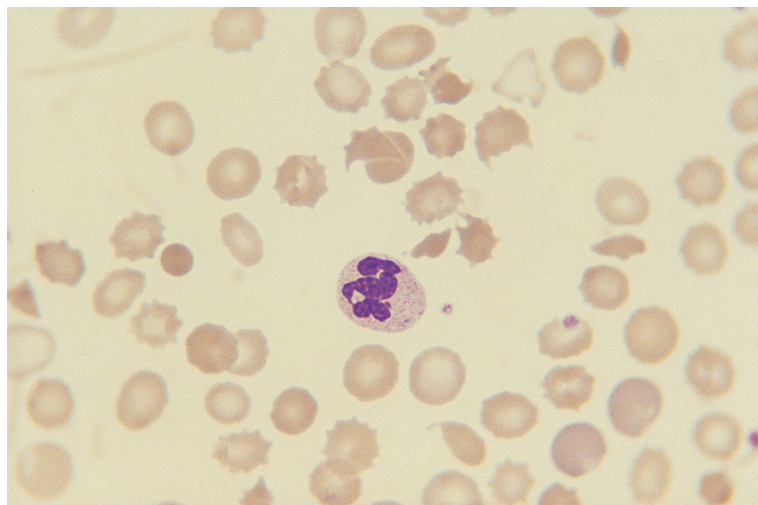


FIGURA 8.72 Distensão sanguínea de paciente adulto no início de síndrome hemolítico-urêmica, mostrando fragmentos e equinócitos. Cortesia do Dr. Ayed Eden, Southend-on-Sea.

de verocitotoxina, causando a síndrome hemolítico-urêmica. Em adultos, as causas mais comuns são púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), hipertensão associada à gravidez e carcinoma. Um surto de síndrome hemolítico-urêmica em 2011, centrado na Alemanha, deveu-se a *E. coli* sorótipo O104:H4; mulheres foram mais afetadas [311].

Pode ocorrer anemia hemolítica semelhante quando há lesões valvulares ou dos grandes vasos ou próteses valvulares cardíacas. Em alguns desses casos, há trombose sobre a superfície anormal; em outros, o dano aos eritrócitos decorre de fluxo turbulento ou de lesão mecânica pelos componentes de uma prótese valvular com mau funcionamento.

Hemograma

A distensão sanguínea mostra microesferócitos, queratócitos e outros esquizócitos, policromatocitose e macrócitos policromáticos. Quando há consumo de plaquetas, trombocitopenia e plaquetas grandes são aparentes. Na síndrome hemolítico-urêmica pós-diarreica da infância, há frequentemente leucocitose e neutrofilia, cuja intensidade correlaciona-se com o dano renal associado; o número de neutrófilos e a duração da neutrofilia são de significação prognóstica [312]. Trombocitopenia prolongada associa-se a sequelas renais em longo prazo [266]. Algumas vezes também há acentuada equinocitose (Figuras 8.72 e 8.73). Na anemia hemolítica microangiopática, costuma haver trombocitopenia associada, mas, afora isso, as distensões sanguíneas da anemia hemolítica microangiopática (Figuras 8.74 e 8.75) e da anemia hemolítica causada por doenças valvulares e dos grandes

vasos, ou por próteses (Figura 8.76), não são fáceis de distinguir. Nas anemias hemolíticas microangiopáticas e mecânicas, a hemólise é intravascular; quando é crônica e severa, a hemoglobinúria resultante pode levar à deficiência de ferro, cujos sinais tornam-se aparentes na distensão sanguínea (Figura 8.77).

Note-se que a fragmentação eritrocitária, embora seja um aspecto frequente da coagulação intravascular disseminada (CIVD) crônica, é rara na CIVD aguda; por esse motivo, o exame da distensão sanguínea não costuma ser útil para triagem de

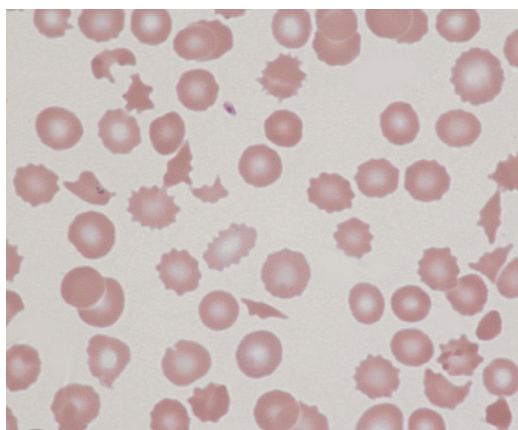


FIGURA 8.73 Distensão sanguínea de paciente adulto hipoesplênico com síndrome hemolítico-urêmica induzida por gencitabina, mostrando esquizócitos, crenação (atribuída ao dano renal agudo), um eritrócito com corpo de Howell-Jolly e trombocitopenia. Alguns esquizócitos são crenados.

FIGURA 8.74 Distensão sanguínea de paciente adulto com síndrome hemolítico-urêmica, mostrando fragmentos, alguns esferócitos e vários macrócitos policromáticos.

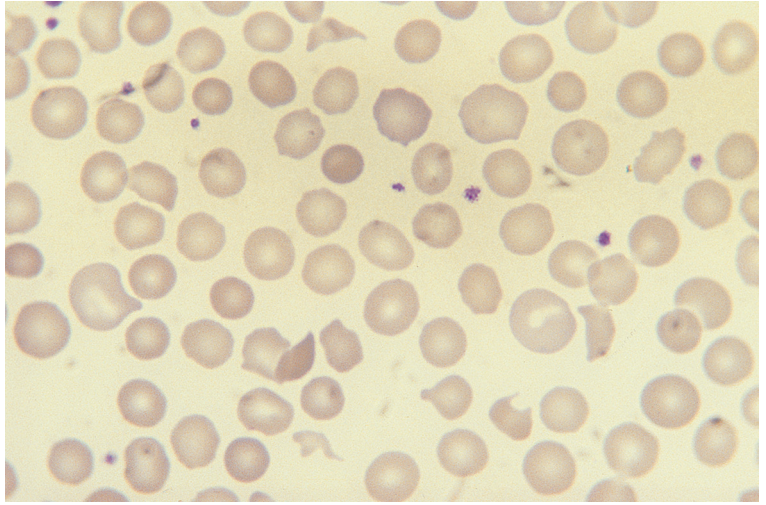
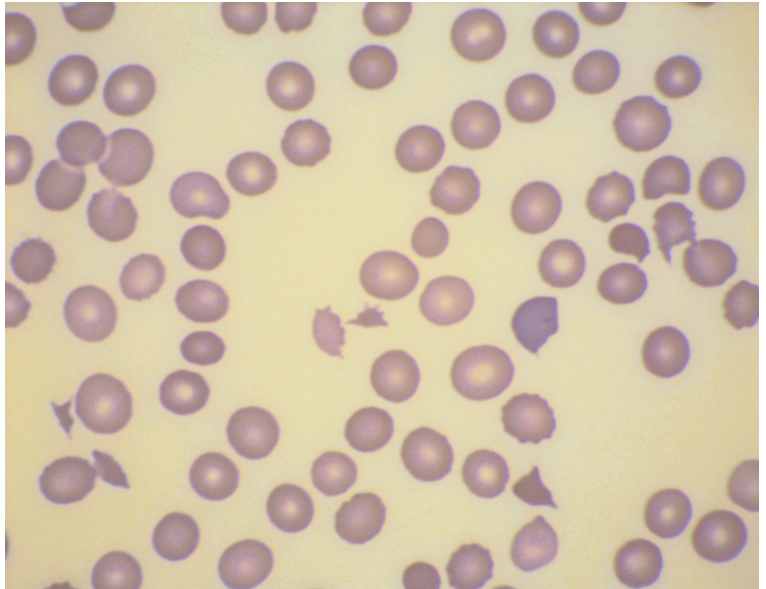


FIGURA 8.75 Distensão sanguínea de paciente adulto com síndrome hemolítico-urêmica induzida por interferon peguillado, mostrando esquizócitos e trombocitopenia.



casos suspeitos de CIVD [313]. O exame é fundamental, por outro lado, na suspeita de PTT ou síndrome HELLP (*Hemólises*, elevação de enzima hepáticas [*Elevated Liver enzymes*], baixa contagem de plaquetas [*Low Platelet count*]). Note-se que, na PTT, a aparição de eritrócitos fragmentados no sangue às vezes demora alguns dias [314].

O International Council for Standardization in Haematology (ICSH), com a finalidade de padronizar a contagem de esquizócitos na suspeita de anemia hemolítica microangiopática, recomendou

que sejam incluídas as formas seguintes: fragmentos com ângulos agudos e bordas retas, pequenos crescentes, células em elmo (*helmet cells*), queratócitos e microesferócitos (se houver outras das formas típicas) [315]. A presença de mais de 1% de esquizócitos, definida dessa maneira, com contagem de 1.000 eritrócitos, é significativa para diagnóstico se fragmentação for a anomalia dominante presente. Um limiar mais alto, de 4%, tem sido usado para o diagnóstico de microangiopatia pós-transplante.

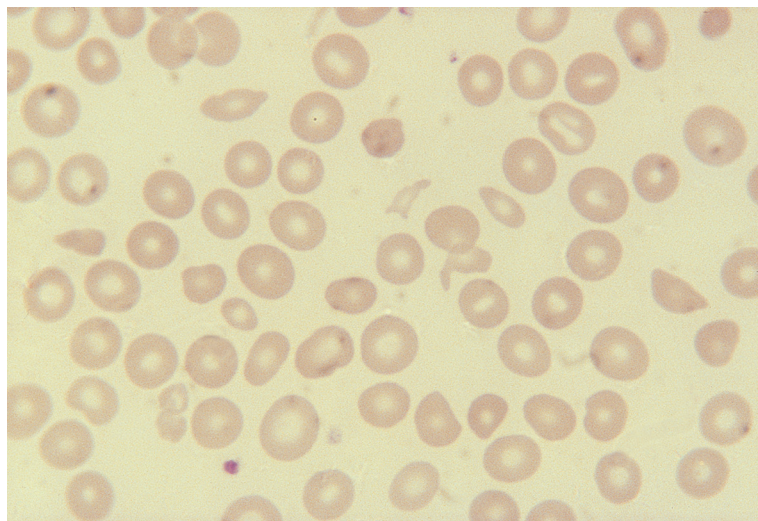


FIGURA 8.76 Distensão sanguínea de paciente com anemia hemolítica mecânica devido a prótese valvular mitral defeituosa, mostrando numerosos fragmentos.

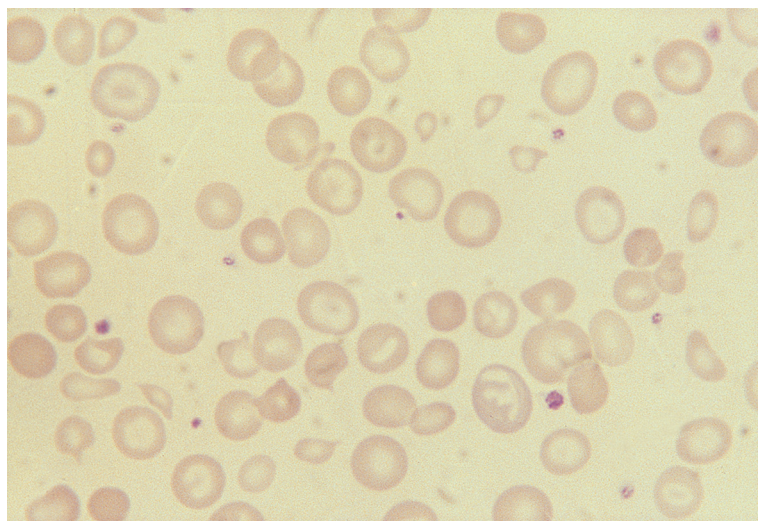


FIGURA 8.77 Distensão sanguínea de paciente afro-caribenho com deficiência de ferro como complicação de hemólise mecânica causada por prótese valvular defeituosa. Há fragmentos, hipocromia, microcitose e eritrócitos em alvo. O paciente também tinha traço de hemoglobinopatia C.

O eritrograma mostra redução de Hb, RDW aumentado e, às vezes, aumento do VCM e do HDW (decorrente da reticulocitose), além de baixa contagem de plaquetas, com VPM aumentado. Pode haver alarme (*flagging*) para presença concomitante de micrócitos e macrócitos. Quando há grande número de esquizócitos, é possível a presença de alarme indicando distinção inadequada entre eritrócitos e plaquetas, assim como a possibilidade de elevação espúria da contagem de plaquetas. Alguns instrumentos (Siemens Advia e Sysmex XE-2100, são capazes de mostrar *flag* e até contar esquizócitos, um número normal (i.e., baixo) tendo alto valor

preditivo negativo (mas com raros falsos-negativos em sangue com VCM > 105 fL [316]. Os histogramas e citogramas (Figuras 8.78 e 8.79) podem mostrar células hiperocrômicas, micrócitos normocrômicos e hiperocrômicos e macrócitos hipocrômicos.

Diagnóstico diferencial

A distensão sanguínea das anemias hemolíticas esquizocíticas é característica; não há, geralmente, dificuldade diagnóstica. Note-se, entretanto, que o hemograma das anemias megaloblásticas pode mostrar um número elevado de esquizócitos e gerar confusão com anemia microangiopática.

SEQ# 0001156
 TIME 16:38 01/06/94
 SYS# 001
 ID 000000108821

CBC			
10.06	$\times 10^9/L$	WBC	
L 3.21	$\times 10^{12}/L$	RBC	
L 9.6	g/dL	HGB	
L .270		HCT	
84.3	fL	MCV	
29.8	pg	MCH	
H 35.4	g/dL	MCHC	
H 18.1	%	RDW	
H 3.78	g/dL	HDW	
L 33*	$\times 10^9/L$	PLT	
L 6.6*	fL	MPV	
H 79.7*	%	PDW	
L .03*	%	PCT	
RBC FLAGS		2311	

%	DIFF	$\times 10^9/L$
67.5	NEUT	6.79
19.6	LYMP	1.98
5.9	MONO H	.60
1.7	EOS	.17
.7	BASO	.07
H 4.6	LUC H	.46
LI		2.12
MPXI		-8.2
WBC FLAGS		4011

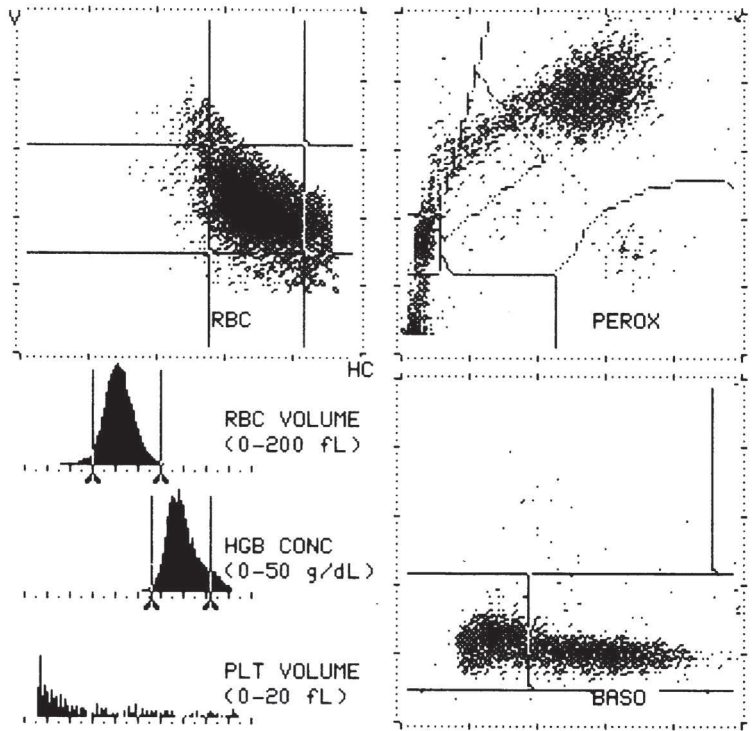


FIGURA 8.78 Citogramas e histogramas Bayer H.2 de eritrócitos e plaquetas de paciente com anemia hemolítica microangiopática. Há muitas células hiper Cromáticas (esferócitos e microsferócitos) e células microcíticas normocromicas (fragmentos). O histograma plaquetário confirma a contagem muito baixa de plaquetas.

Exames adicionais

A rápida identificação da síndrome hemolítico-urêmica pelo laboratório é de importância crítica para um tratamento ótimo. Além disso, para o tratamento adequado da insuficiência renal, são necessárias coproculturas imediatas para que sejam evitados tratamentos prejudiciais, como antibióticos e medicamentos para reduzir a motilidade intestinal [266]. Há relato de óbito devido a atraso no diagnóstico por não ter sido examinada a distensão sanguínea [317]. O diagnóstico rápido da PTT é igualmente crítico, pois a plasmáfereze deve ser iniciada imediatamente; deve ser lembrado que a falta inicial de fragmentação eritrocitária não exclui o diagnóstico, pois pode ser mais tardia. Pacientes com aspectos clínicos e laboratoriais de PTT devem fazer teste para HIV.

Dosagens de bilirrubina e de LDH e contagem de reticulócitos são úteis para avaliar a severidade da hemólise. Nos casos que apresentam hemólise pequena e crônica, com pequeno número de eritrócitos fragmentados, a detecção de hemossiderina no

sedimento urinário é útil para demonstrar que houve hemólise intravascular.

Anemia hemolítica induzida por agentes oxidantes

A exposição a agentes oxidantes suficientemente potentes, tanto drogas como agentes químicos, pode causar anemia hemolítica mesmo em indivíduos com atividade enzimática normal de G6PD e das demais enzimas do *shunt* da pentose; neonatos, especialmente prematuros, são particularmente suscetíveis. Agentes oxidantes podem provocar metemoglobinemia, como resultado da oxidação da hemoglobina, e anemia hemolítica aguda ou crônica, como resultado da oxidação tanto da hemoglobina quanto de componentes da membrana. Quando a hemólise é aguda, a hemoglobina oxidada precipita como corpos de Heinz, por isso o nome "anemia hemolítica com corpos de Heinz". Corpos de Heinz são removidos pelo baço, mas, quando a hemólise é aguda, podem ser detectados em eritrócitos circulantes antes da remoção.

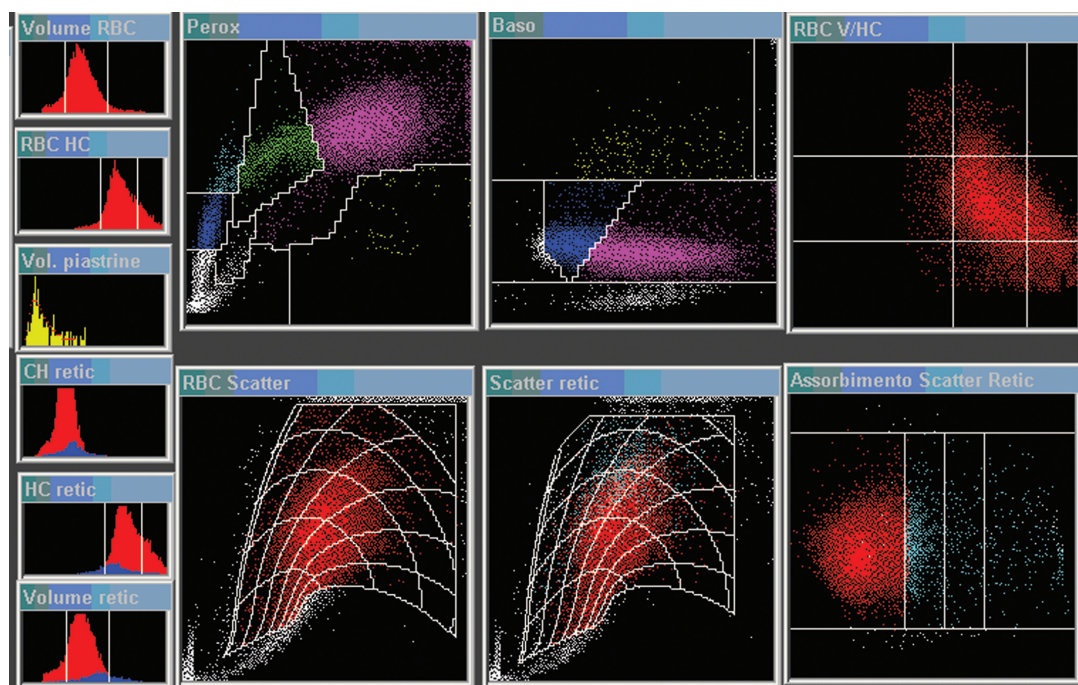


FIGURA 8.79 Hemograma (série Siemens Advia) de paciente com púrpura trombocitopênica trombótica: leucócitos $19,17 \times 10^3/\mu\text{L}$, E $1,45 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 4,2 f/d/L, Hct 12%, VCM 82,7 fL, HCM 28,9 pg, CHCM 34,4 g/dL, média das concentrações hemoglobínicas corpusculares (MCCH) 36,1 g/dL, RDW 25,6%, plaquetas $17 \times 10^3/\mu\text{L}$, reticulócitos 7,9%, $114 \times 10^3/\mu\text{L}$. O citograma eritrocítico e o histograma de volume corpuscular/concentração hemoglobínica (RBC V/HC) mostra um aumento de células com alta concentração hemoglobínica (à direita do limiar vertical direito) e *flag* hiperchromia +++. Há também *flag* para eritroblastos. Eritrócitos fragmentados 2,5%. Cortesia da Professora Gina Zini.

Na maioria dos casos, os agentes oxidantes causais de hemólise são fármacos, especialmente a dapsona e a sulfassalazina. A hemólise também pode resultar de contaminação da água potável por nitrato, ou de exposição accidental ou deliberada a agentes químicos agrícolas e industriais. Sulfato de cobre, ingerido com intento suicida, é uma causa comum em alguns países.

Note-se que, se o paciente tiver tanto metemoglobinemia quanto anemia hemolítica, os sintomas serão mais graves do que os previstos para o grau de anemia; isso deve-se ao fato de a metemoglobina ser imprópria para o transporte de oxigênio e, além disso, causar um desvio à esquerda da curva de dissociação, prejudicando ainda mais a liberação tecidual de oxigênio.

Hemograma

Quando a hemólise é aguda, a distensão sanguínea (Figura 8.80) é semelhante à da deficiência de G6PD durante os episódios hemolíticos agudos. Corpos de Heinz podem produzir uma protrusão

visível na superfície dos eritrócitos, cujo mecanismo de produção torna-se aparente à microscopia eletrônica [318]: eles não apenas se ligam à membrana, mas passam através dela (Figura 8.81). Quando a hemólise é leve e crônica, há um número variável de eritrócitos irregularmente contraídos e mordidos, macrocitose e macrócitos policromáticos.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com a deficiência da G6PD, com a presença de hemoglobina instável e com as outras causas de aparecimento de eritrócitos irregularmente contraídos (ver Capítulo 3).

Exames adicionais

O diagnóstico geralmente pode ser feito a partir da história clínica e da distensão sanguínea. A preparação para corpos de Heinz é positiva nos casos agudos. Em alguns pacientes, depois de transcorrido o episódio de hemólise, pode ser necessário confirmar que a atividade da G6PD é normal.

FIGURA 8.80 Distensão sanguínea de paciente em tratamento com dapsona para uma dermatopatia, mostrando macrocitose, células irregularmente contraídas e várias células mordidas (*bite cells*).

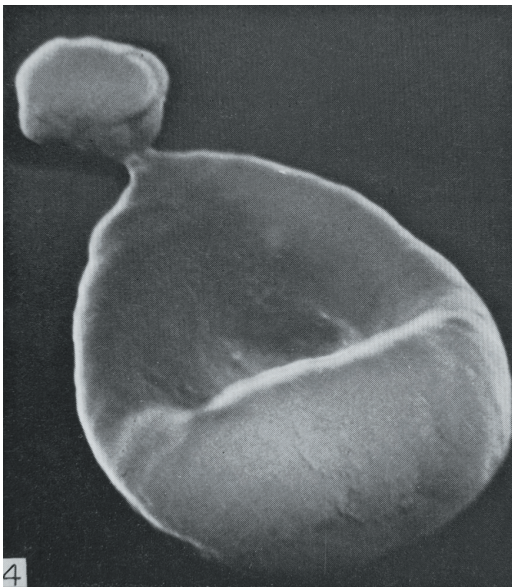
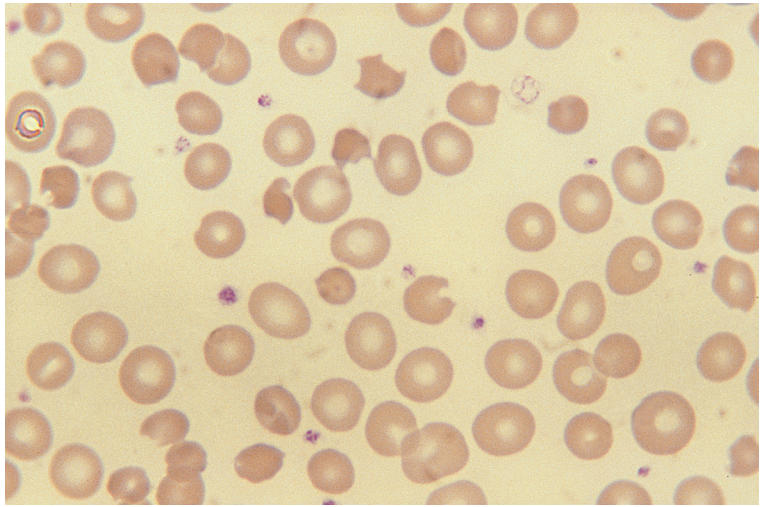


FIGURA 8.81 Fotografia com microscópio eletrônico de varredura de eritrócito com um corpo de Heinz que se projeta pela membrana. Cortesia do Dr. M. Amare e colaboradores, Kansas City.

Deficiência neonatal de glutatião-peroxidase

No período neonatal, pode haver deficiência transitória de glutatião-peroxidase como decorrência de carência de selênio, um cofator essencial.

Hemograma

A distensão sanguínea mostra eritrócitos irregularmente contraídos e os demais aspectos de hemólise por dano oxidante.

Doença renal

Na insuficiência renal aguda, a sobrevida eritrocitária em geral está encurtada; sinais de anemia microangiopática são comuns. Na insuficiência renal crônica, a diminuição da sobrevida é coadjuvante no mecanismo de anemia, mas não a causa principal; alguns queratócitos e outros fragmentos podem estar presentes. Ocasionalmente, há equinócitos. Na insuficiência renal crônica, a curva de dissociação de oxigênio frequentemente está desviada à direita, melhorando a entrega de oxigênio aos tecidos e reduzindo o estímulo à eritropoese [319].

Doença hepática

Doença hepática associa-se com várias síndromes hemolíticas. Na síndrome de Zieve, há hepatopatia alcoólica aguda associada a hiperlipidemia e hemólise aguda. Zieve [320] e outros autores [321] descreveram as células anormais como “esferócitos”, e, em um caso, Zieve suspeitou de anemia hemolítica congênita. Entretanto, as ilustrações originais mostravam eritrócitos irregularmente contraídos [321]; estes, às vezes, estão presentes em número chamativo (Figura 8.82). Uma síndrome distinta, inicialmente chamada de “anemia hemolítica de células em espora” (*spur cell anemia*), que se caracteriza pela presença de numerosos acantócitos (Figura 8.83), é causada por insuficiência hepática de qualquer etiologia.

Doença de Wilson

A doença de Wilson pode causar tanto anemia hemolítica aguda sem anormalidade morfológica quanto anemia hemolítica aguda com corpos de

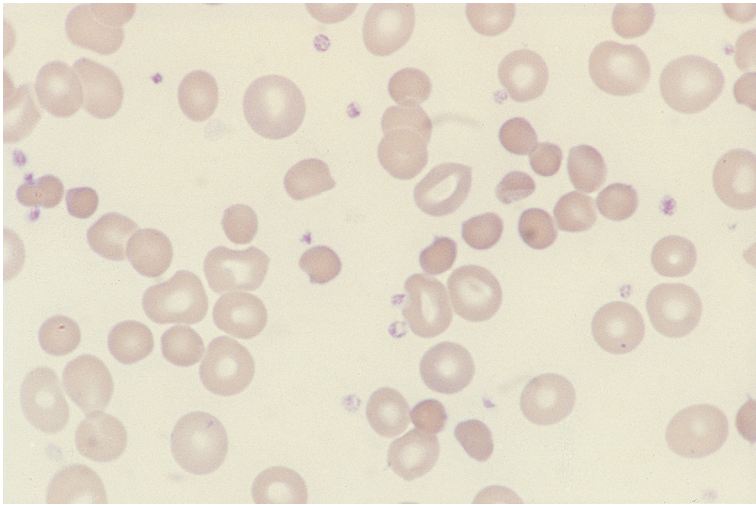


FIGURA 8.82 Distensão sanguínea de paciente com síndrome de Zieve, como complicação de hepatopatia alcoólica aguda, mostrando células irregularmente contraídas e macrócitos policromáticos.

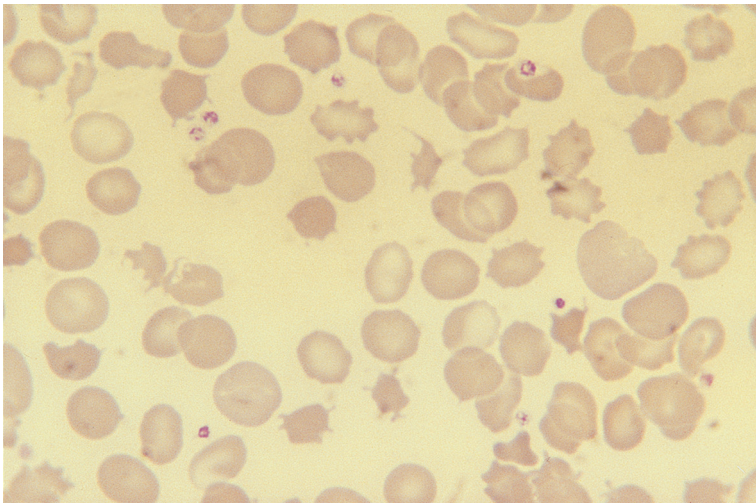


FIGURA 8.83 Distensão sanguínea de paciente com hepatopatia terminal de etiologia desconhecida, mostrando numerosos acantócitos (anemia hemolítica de células em espora).

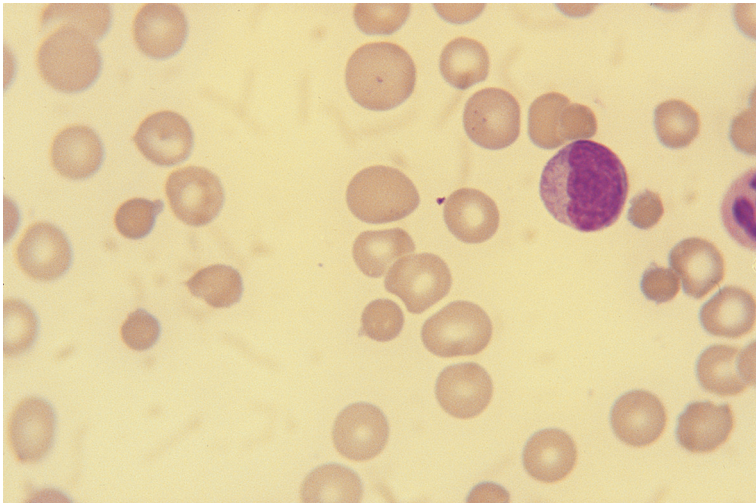


FIGURA 8.84 Distensão sanguínea de paciente com hepatopatia terminal como complicação de doença de Wilson, mostrando células irregularmente contraídas e macrócitos policromáticos.

Heinz, como resultado da liberação súbita de cobre por um fígado gravemente lesado [322] (Figura 8.84). É importante pensar na possibilidade de doença de Wilson previamente não diagnosticada sempre que uma anemia hemolítica aguda não tiver explicação, uma vez que esta pode ser a primeira manifestação de uma condição que é fatal quando não tratada.

Diabetes melito

Hemólise compensada sem anemia ou anormalidades morfológicas parecem ser comuns no diabetes melito [323].

Deficiência de vitamina E e picnositose infantil

Deficiência de vitamina E pode causar hemólise, particularmente em neonatos, e quando é usado leite suplementado com ferro na alimentação. Esta pode ser a apresentação inicial de fibrose cística [324]. A distensão sanguínea mostra “picnócitos”, eritrócitos irregularmente contraídos e espiculados, similares aos acantócitos. Outras causas de picnositose infantil podem decorrer de estresse oxidante sem deficiência de vitamina E [325]. Nos instrumentos Siemens, podem ser notadas nos *scatter plots* duas populações eritroides, normais e anormais, de densidades (concentrações hemoglobínicas) diferentes; os reticulócitos têm distribuição normal de densidade [325].

Depleção de fosfato

A depleção de fosfato, causando redução de ATP, é uma causa rara de anemia hemolítica. É o mecanismo provável de um caso descrito de anemia

hemolítica em associação com hipofosfatemia, durante a realimentação de uma paciente com anorexia nervosa [326].

Infecções bacterianas e parasitárias

Bartonelose, malária e babesiose caracteristicamente causam anemia hemolítica. Raramente, também é vista anemia hemolítica em pacientes esplenectomizados com doença de Whipple. Infecções bacterianas e virais podem estar associadas à anemia hemolítica microangiopática. A toxina clostrídica pode causar grave anemia hemolítica esferocítica. Infecção por *Bacillus cereus* pode desencadear hemólise súbita e severa: o hemograma mostra estromas eritrócíticos e esferócitos. Infecções podem, também, alterar a membrana eritrocitária, causando ativação do antígeno T; anticorpos anti-T, presentes no plasma, ligam-se, então, aos eritrócitos, causando esferocitose e hemólise. Essa complicação foi observada em infecções por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, pneumococo e na enterite necrosante causada por *Clostridium perfringens* (antes designado *C. welchii*). Após transfusão de sangue normal contendo anticorpos anti-T, pode ocorrer hemólise aguda; esse tipo de hemólise deve ser incluído no diagnóstico diferencial dos demais tipos de reação transfusional hemolítica [327].

Picadas de ofídios e artrópodes

Picadas de diversos ofídios e artrópodes podem causar anemia hemolítica esferocítica ou microangiopática (Figura 8.85), às vezes associada com CIVD e trombocitopenia [328].

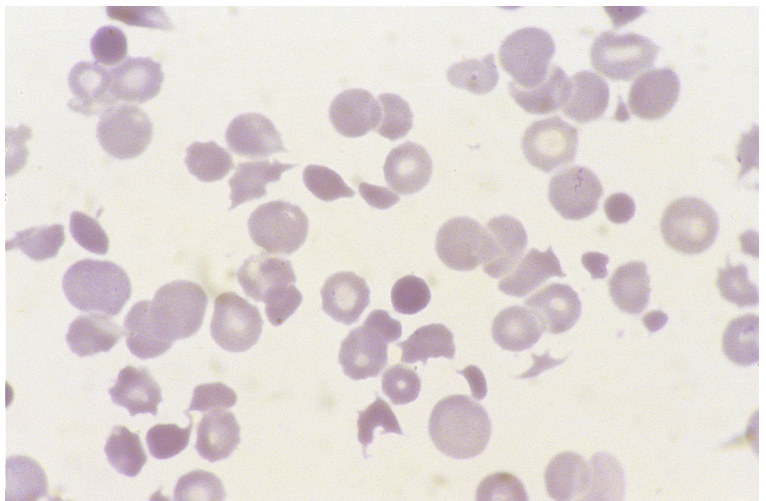


FIGURA 8.85 Distensão sanguínea de paciente do Sri Lanka que foi picado por uma víbora, mostrando fragmentos e microesferócitos. Cortesia do Dr. Sudharma Vidyatilake, Colombo.

Hemoglobinúria da marcha

O termo “hemoglobinúria da marcha” descreve a anemia hemolítica observada em soldados durante marchas forçadas. Embora a hemólise seja mecânica, resultando de dano aos eritrócitos nos pequenos vasos dos pés, raramente são observados fragmentos ou outros achados específicos. Um tipo similar de hemólise pode ser induzido pela corrida sobre superfícies duras, pelo caratê, ao jogar tênis ao tocar bongô com as mãos e até nadando. Deve-se indagar especificamente acerca dessas circunstâncias sempre que houver uma anemia leve e inexplicada, em indivíduo aparentemente saudável, em geral jovem. Anemia relacionada ao exercício também pode decorrer de patogênese distinta, como hemorragia gastrointestinal em corredores.

Hemólise causada por infusão de fluidos hipotônicos

Hemólise intravascular aguda, sem alterações esclerecedoras no hemograma, pode ser desencadeada pela infusão intravascular inadvertida de fluidos hipotônicos.

Hemoglobinúria paroxística noturna

Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é um distúrbio clonal das células indiferenciadas da hematopoese, originando eritrócitos com um defeito específico da membrana que os torna anormalmente sensíveis à lise induzida por complemento. A HPN resulta de uma mutação somática adquirida no gene da fosfatidil-inositol glicano classe A (*PIGA*), que leva a uma deficiência de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e, portando, das numerosas proteínas ancoradas no GPI [329]. Uma tendência a hipoplasia ou aplasia

medular também deve estar presente para que o clone seja favorecido. Alguns pacientes apresentam história de hemólise noturna, isto é, referem que a primeira amostra de urina da manhã é vermelha ou pardo-escura. Deve-se suspeitar de HPN sempre que houver anemia hemolítica inexplicada, particularmente se associada a leucopenia ou trombocitopenia. Leucemia mieloide aguda (LMA) e SMD podem desenvolver-se durante o curso da HPN.

Note-se que, muito raramente, o fenótipo HPN resulta de deficiência hereditária de CD59 (inibidor da membrana de hemólise reacional, MIRL) [330].

Hemograma

A distensão sanguínea não mostra sinais específicos; macrócitos policromáticos podem estar presentes (Figura 8.86). E 80% dos pacientes, há neutropenia e/ou trombocitopenia [329].

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outras causas de anemia normocítica e de pancitopenia.

Exames adicionais

O diagnóstico pode ser confirmado por citometria de fluxo usando-se anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos ancorados no GPI, como CD55 e CD59, em eritrócitos ou neutrófilos. A ausência desses antígenos também pode ser demonstrada por uma modificação da técnica de gel-centrifugação usada para tipificação sanguínea. Se essa tecnologia não estiver disponível, pode ser feito o teste de Ham, que evidencia hemólise pela exposição a soro fresco acidificado.

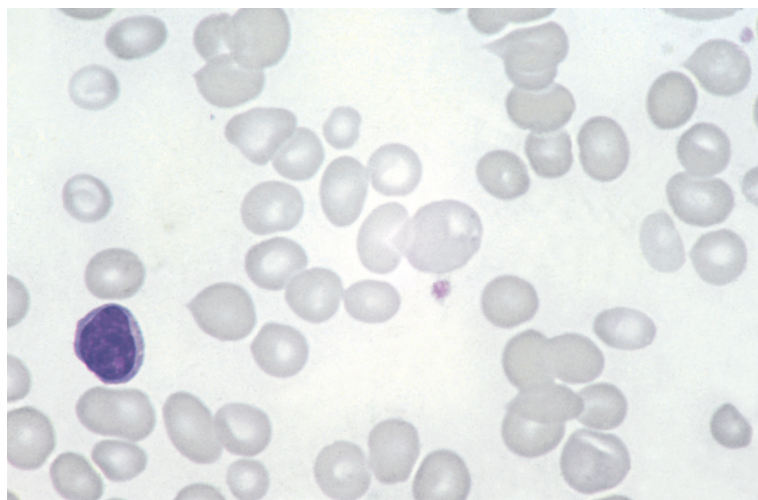


FIGURA 8.86 Distensão sanguínea de paciente com hemoglobinúria paroxística noturna, mostrando macrócitos policromáticos.

Causas variadas de anemia hemolítica

Anemia hemolítica com testes antiglobulina negativos e sem aspectos morfológicos esclarecedores, às vezes acompanhada de trombocitopenia, foi descrita como um fenômeno transitório em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C [331].

Hemólise como fator coadjuvante de anemia

Um encurtamento da sobrevida eritrocitária pode fazer parte da patogênese de anemia apesar de não ser seu mecanismo primário; isso ocorre na anemia ferropênica [19], na desnutrição proteíno-calórica [332] e na leishmaniose (possivelmente por mecanismo imunológico) [333].

Anemias diseritropoéticas

Anemias diseritropoéticas congênicas

São distúrbios hereditários raros, caracterizados por eritropoiese displásica e ineficaz, encurtamento da

sobrevida eritroide e anemia com considerável e variada pecilocitose. Há três tipos bem-definidos, cujas características são resumidas nas Tabelas 8.9 e 8.10. Há casos, também, que parecem corresponder a esses tipos, mas que têm uma herança diferente e, portanto, presume-se, um defeito subjacente distinto. Há casos autossômicos dominantes, semelhantes ao tipo I, e casos aparentemente autossômicos recessivos, semelhantes ao tipo III. Além disso, há casos individuais ou famílias com características peculiares, que incluem anemia megaloblástica congênita independente de deficiências de vitamina B₁₂ ou ácido fólico e casos com variadas inclusões nos eritrócitos [334]. Também foram descritas variantes com microcitose atribuível a eritropoiese sideroblástica [340] e com ovalocitose proeminente [341]. Há dois casos descritos, com aspectos similares aos do tipo II, mas com esferocitose e teste de Ham negativo [342]. Casos com herança ligada ao sexo e trombocitopenia coexistente podem ser consequentes a

TABELA 8.9 Características genéticas, distribuição étnica e demais aspectos das anemias diseritropoéticas congênicas [334-338]

Tipo	Herança (casos relatados)	Gene	Origem étnica e características associadas
Tipo I	AR (mais de 150)	CDAN1 em 15q15.1-15.3; alguns casos não relacionados ao cromossomo 15	Branços (inclusive alemães, suíços, iugoslavos, russos), turcos, beduínos israelitas, libaneses, kuwaitianos, saudi-arábicos, norte-africanos, indianos, japoneses, polinésios; anomalias constitucionais associadas, como dismorfismo facial e anomalias dos membros distais, são comuns
Tipo II (HEMPAS)	AR (mais de 300)	SEC23B em 20q11.2 em 90%, desconhecido nos outros	Branços (especialmente italianos), indianos, e norte-africanos; sobrevida eritrocítica encurtada
Tipo III	AD em 2 famílias, sueca e americana (rara)	KIF23 em 15q23 em famílias suecas e norte-americanas	Famílias suecas, americanas, filipinas e argentinas; família sueca mostra associação com anomalias retinianas e neoplasias plasmocíticas; hemólise intravascular
Tipo IV	AD (rara)	KIF1 em 19p13.2	Um caso dinamarquês

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; HEMPAS, acrônimo de *Hereditary Erythroid Multinuclearity with Positive Acidified-Serum lysis test*.

TABELA 8.10 Eritrograma nas anemias diseritropoéticas congênicas [247,248]

Tipo	Tamanho do eritrócito (VCM)	Outras características da distensão sanguínea
Tipo I	Geralmente macrocítico	Macrócitos ovais ou redondos, anisocitose acentuada, pecilocitose acentuada, incluindo eliptócitos e células em lágrima, pontilhado basófilo, células irregularmente contraídas, policromatofilia
Tipo II (HEMPAS)	Normocítico	Anisocitose moderada, anisocromia variável, pecilocitose moderada, incluindo células pinçadas [339], células em lágrima e irregularmente contraídas, esferócitos ocasiona pontilhado basófilo, alguns eritroblastos, policromatofilia
Tipo III	Normocítico ou levemente macrocítico	Anisocitose considerável com alguns macrócitos enormes, pecilocitose acentuada, incluindo fragmentos e células irregularmente contraídas, pontilhado basófilo, policromatofilia; alguns pacientes com deficiência de ferro superimposta
Tipo IV	Normocítico, normocrômico	Pontilhado basófilo, eritroblastose, alguns com contorno nuclear irregular; pode haver reticulocitose

*HEMPAS, acrônimo de *Hereditary Erythroid Multinuclearity with Positive Acidified-Serum lysis test*.

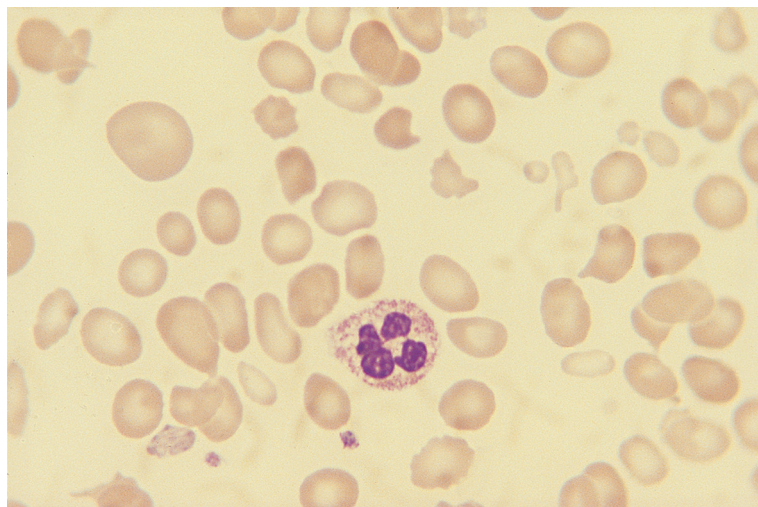


FIGURA 8.87 Distensão sanguínea de paciente com anemia diseritropoética congênita do tipo I, mostrando anisocitose e pecilocitose consideráveis e alguns grandes macrócitos.

mutação no gene *GATA1* [343, 344]. Foi proposta uma classificação provisória dessas formas atípicas como anemias diseritropoéticas tipos IV a VII [247] ao identificar ao menos 3 famílias não relacionadas [334, 336]. Também foi sugerido que casos de eritropoese ineficaz congênita, mesmo sem displasia eritroide evidente, fossem incluídos na categoria de anemias diseritropoéticas congênicas [334].

Os genes implicados nos três tipos principais de anemia diseritropoética congênita estão atualmente identificados. Tipo I deve-se à mutação em *CDAN1*, que codifica codanina; tipo II, a mutação em *SEC23B*; e tipo III, a mutação em *KIF23* [345]. Uma mutação em *KLF1* foi identificada no tipo IV [338]. Alguns casos, em especial do tipo I, têm outras anomalias congênicas associadas. Os pacientes apresentam-se tipicamente com anemia, hepatomegalia, esplenomegalia e icterícia intermitente. Os casos do tipo III são mais benignos do que os dos tipos I e II. Observou-se que o traço β -talassêmico agrava o tipo II. Casos do tipo IV podem ser tão graves a ponto de causar hidropisia fetal [338].

Como o interferon- α mostrou-se de considerável eficácia terapêutica no tipo I, o diagnóstico laboratorial exato dessa rara doença tornou-se importante. O diagnóstico correto também contribui para redução da sobrecarga de ferro e do dano sistêmico decorrente.

Hemograma

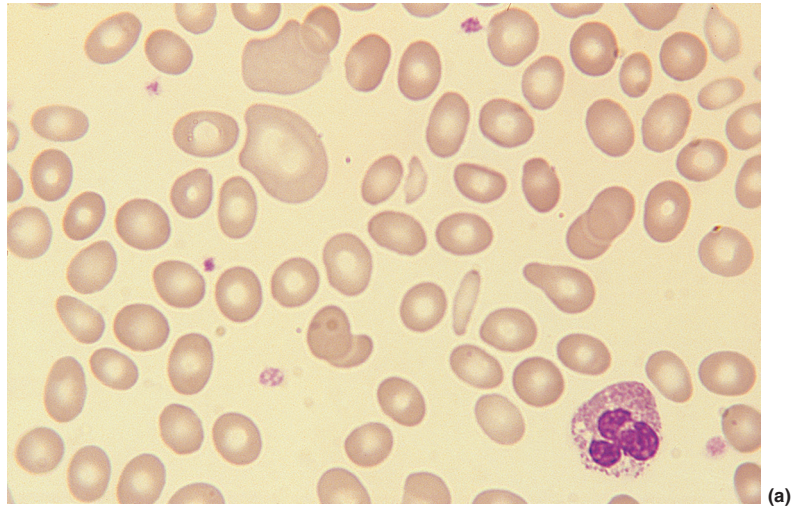
Em uma minoria de casos, a anemia é severa; geralmente, é leve ou moderada. Alguns casos são macrocíticos, outros, normocíticos. Os eritrócitos mostram acentuada anisocitose e considerável

pecilocitose (Figuras 8.87 e 8.88), mas na anemia diseritropoética congênita tipo II as alterações morfológicas dos eritrócitos podem ser surpreendentemente pouco chamativas (Figura 8.89). A hemoglobinizacão é em geral normal, mas alguns eritrócitos podem ser insuficientemente hemoglobinizados. A contagem absoluta de reticulócitos é normal; em alguns casos, há eritroblastos circulantes, que se tornam numerosos após esplenectomia [346]; a eritroblastose é considerável nos casos correlacionados à mutação *KLF1* (tipo IV) [338]. O HDW está aumentado, o RDW, acentuadamente aumentado, o que se reflete nos citogramas e histogramas (Figura 8.90).

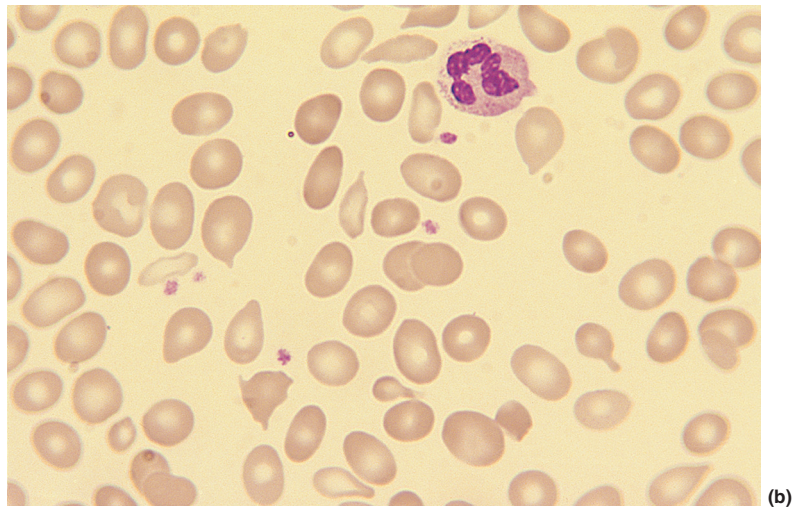
Uma queda súbita de Hb com reticulocitopenia extrema, decorrente de aplasia eritroide pura, tem sido descrita após infecção por parvovírus B19 em pacientes com anemia diseritropoética do congênito II [347]. Na anemia diseritropoética congênita resultante de mutação no gene *GATA1*, há trombocitopenia com plaquetas grandes (ver Tabela 8.13). Acantocitose, que não é um aspecto característico de anemia tropoética congênita [CDA], tem sido notada nessa síndrome [343, 344]. Em alguns casos de anemia diseritropoética congênita tipo II, pode haver trombocitopenia.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui as anemias hemolíticas em que há anormalidades morfológicas acentuadas, em particular a piropecilocitose hereditária e a hemoglobinopatia H. Em ambas as condições, a contagem de reticulócitos está elevada; na



(a)



(b)

FIGURA 8.88 (a, b) Distensão sanguínea de paciente com anemia diseritropoética congênita tipo III mostrando anisocitose e pecilocitose. Cortesia do falecido Professor Sunitha Nimal Wickramasinghe.

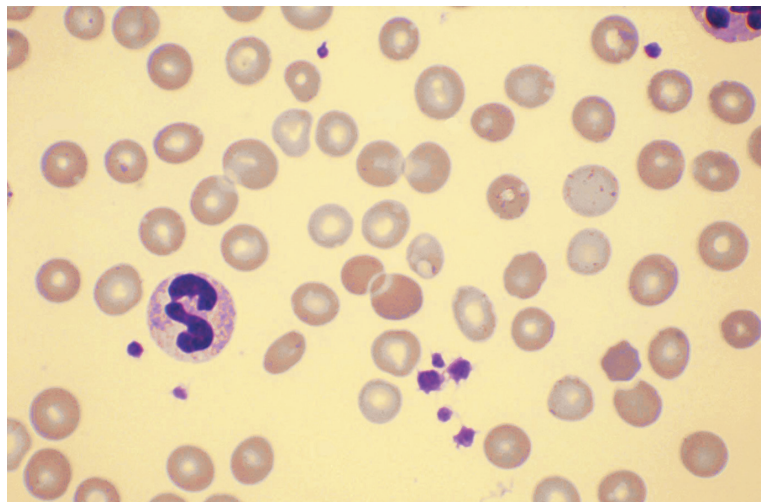


FIGURA 8.89 Distensão sanguínea de anemia diseritropoética congênita tipo II, mostrando apenas anisocitose e pecilocitose discretas.

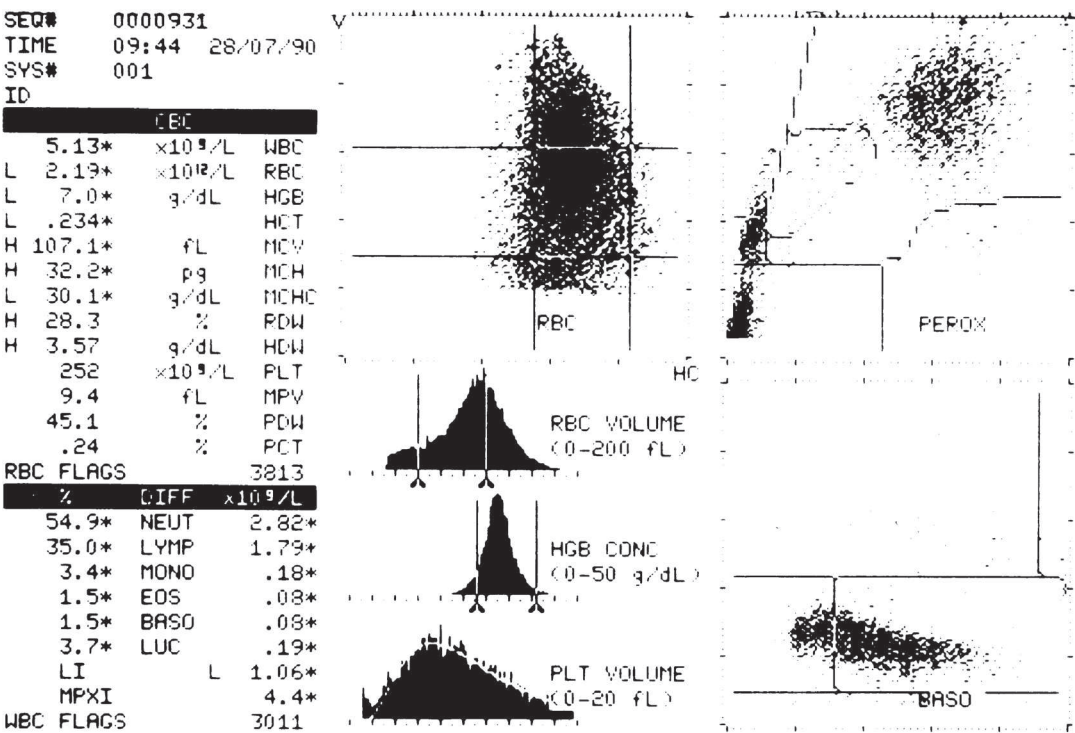


FIGURA 8.90 Histogramas e citogramas Bayer H.2 de paciente com anemia diseritropoética congênita tipo I (o mesmo paciente da Figura 8.87), mostrando acentuada variação de tamanho dos eritrócitos (notado no RDW 28,3 e no histograma RBC VOLUME) e grau menor de variação da hemoglobinizacão dos eritrócitos (que se reflete no HDW aumentado).

hemoglobinopatia H, há hipocromia e microcitose. Os casos que se apresentam após a infância precisam ser distinguidos das SMDs e das demais condições que causam diseritropoese adquirida. Nas anemias diseritropoéticas congênitas, as linhagens não eritroides não costumam mostrar aspectos displásicos significativos.

Exames adicionais

Um diagnóstico presuntivo pode ser feito pelo hemograma. A confirmação requer exame da medula óssea; o exame ultraestrutural é particularmente útil. No tipo I, pode haver aumento da porcentagem de hemoglobina A₂ e redução leve na proteína da membrana 4.1 [93]. Em casos suspeitos de anemia diseritropoética do tipo II, é importante demonstrar a positividade do teste de lise em soro acidificado (teste de Ham); para isso, deve-se testar os eritrócitos do paciente com múltiplos soros frescos. O tipo II igualmente mostra expressão aumentada do antígeno i e, em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, a banda 3 da membrana dos eritrócitos, que é hipoglicosilada, exibe

migração anormal. No tipo II, a ligação de eosina-5-maleimida (EMA), à citometria em fluxo, pode ser normal ou diminuída [117, 127], a fragilidade osmótica pode estar aumentada e o tempo de lise em glicerol acidificado, diminuído [127]. A timidinaquinase está aumentada no tipo III. A anemia diseritropoética devida à mutação *KLF1* está associada com acentuado aumento da hemoglobina F, persistência da hemoglobina Portland, falta de expressão de CD44 nos eritrócitos e diminuição de expressão de AQPI [338]. Bilirrubina e LDH estão aumentadas, e haptoglobina, diminuída. Em casos mais graves, pode haver hemossiderinúria significativa.

Anemias diseritropoéticas adquiridas

A diseritropoese como um fenômeno adquirido pode ser secundária a desnutrição protéico-calórica grave, a doença aguda grave, a doença autoimune, à infecção por HIV ou à exposição a fármacos (como os citotóxicos) ou substâncias tóxicas (como álcool e arsênico). Também pode ser uma manifestação de SMD (ver Capítulo 9) ou de outras neoplasias

hematológicas. Diseritropoese severa foi observada, em época próxima ao parto, em mulheres com hipertensão associada à gravidez e infecção por parvovírus B19 [348].

Hemograma

Os eritrócitos podem mostrar anisocitose, pecilocitose, macrocitose ou pontilhado basófilo, e pode haver uma população de micrócitos hipocrômicos. A diseritropoese em neutrófilos pode manifestar-se como hipogranularidade e defeitos da lobulação nuclear. As contagens automatizadas podem mostrar anemia, neutropenia e trombocitopenia. Também há possibilidade dos histogramas e citogramas exibirem aumento de VCM, RDW e HDW.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as anemias diseritropoéticas congênitas e com outras causas de anemia, com ou sem outras citopenias.

Exames adicionais

Exames adicionais serão indicados de acordo com o contexto clínico e as anormalidades citológicas específicas presentes.

Anemias aplásticas e aplasia eritroide pura

Anemia aplástica congênita

Há várias síndromes hereditárias raras em que as células primitivas da hematopoese são anormais, causando anemia aplástica que inicia na infância ou na adolescência. A menos rara é a anemia de Fanconi, um grupo de diversos distúrbios genéticos em que geralmente há outras anomalias constitucionais, incluindo retardo mental, alterações da pigmentação cutânea, anomalias urogenitais e anomalias dos membros e dos dedos. Há ao menos 16 genes cujas mutações levam a esse fenótipo; a herança é autossômica recessiva. A anemia de Fanconi pode progredir para SMD e LMA. Pode haver melhora das contagens sanguíneas na anemia de Fanconi por conversão do gene ou por uma segunda mutação que compense a anomalia herdada [349]. Uma condição ainda mais rara que faz desenvolver anemia aplástica é a disceratose congênita, também caracterizada por anormalidades proeminentes da pele e das unhas; a herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva ou recessiva ligada ao sexo. A maioria dos casos resulta de mutação em *DKC1*, *TERC*, *TERT* ou *TINF2*, mas um total de 9 genes já foram implicados.

Hemograma

Há trombocitopenia que, geralmente, é o aspecto mais precocemente notado. A anemia em geral é macrocítica e acompanhada de reticulocitopenia. Às vezes, há anisocitose e pecilocitose acentuadas. Com a progressão, há pancitopenia.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a anemia aplástica adquirida e com as demais causas de anemia ou pancitopenia.

Exames adicionais

O diagnóstico de anemia aplástica requer, em geral, biópsia de medula óssea. O diagnóstico da anemia de Fanconi costuma ser complementado pela pesquisa citogenética de suscetibilidade à fragmentação cromossômica pela exposição de células hematopoéticas a agentes clastogênicos (diepoxibutano e mitomicina C). Note-se que, em cerca de 10% dos casos, não se observa suscetibilidade a esses agentes [33]; algumas vezes, há suscetibilidade nos fibroblastos da pele, mas esta é normal nos linfócitos. Um exame mais econômico e eficaz é a dosagem sérica de α -fetoproteína; ela está aumentada na maioria dos pacientes e não se eleva nas demais síndromes de insuficiência da medula óssea [350]. Demonstração de um bloqueio em G2 no exame do ciclo celular é também um teste diagnóstico sensível; a hemoglobina F costuma estar aumentada. O diagnóstico da disceratose congênita pode ser facilitado pela demonstração de encurtamentos dos telômeros nos linfócitos do sangue periférico, por reação em cadeia da polimerase, citometria em fluxo ou *Southern blotting*. Análise de DNA pode ser usada para confirmação diagnóstica em ambas as síndromes.

Anemia aplástica adquirida

A anemia aplástica pode ser (i) um efeito dose-dependente de irradiação ou de certos fármacos e agentes químicos (p. ex., fármacos antilblásticos e benzeno); (ii) reação idiossincrásica a um fármaco (p. ex., cloranfenicol, sulfonamidas e fármaco correlatos, incluindo fármacos antitireóideos); e (iii) resultado de infecção por certos vírus, possivelmente hepatite não A, não B, não C e, certamente, o vírus de Epstein-Barr em pacientes com imunidade defeituosa. Em muitos casos, cuja causa permanece obscura, a condição é classificada como idiopática. A anemia aplástica pode ser fatal; a morte sobrevém por infecção ou hemorragia. Em pacientes que sobrevivem, por exemplo, com tratamento imunossupressivo, podem surgir posteriormente, HPN, SMD e LMA.

Hemograma

Há pancitopenia com diminuição acentuada da contagem absoluta de reticulócitos. Os eritrócitos são normocrômicos, normocíticos ou macrocíticos; às vezes há acentuada pecilocitose. Os neutrófilos podem mostrar granulação grosseira. As plaquetas têm tamanho e aspecto normais. Contrastando com a pancitopenia decorrente de infiltração da medula óssea, não se observam precursores granulocíticos e eritroblastos no sangue periférico.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as anemias aplásticas congênicas – especialmente quando estas têm começo tardio e anomalias associadas discretas ou ausentes –, com a apresentação aplástica de leucemia linfoblástica aguda, com casos hipoplásticos de LMA e de SMD, com a infecção por HIV e com as demais causas de pancitopenia.

Exames adicionais

Exames da medula óssea por aspiração e biópsia são indispensáveis para o diagnóstico. É indicada análise citogenética, embora a detecção de um clone anormal não indique necessariamente progresso rápido para SMD ou LMA. Pacientes com menos de 35 anos devem ser testados para anemia de Fanconi, mesmo na ausência de anomalias constitucionais; isso é particularmente necessário se houver perspectiva de transplante de células-tronco. A citometria em fluxo detecta um pequeno clone de HPN no sangue periférico em mais de 60% dos casos; o achado é preditivo de melhor resposta a tratamento imunossupressivo e de melhor sobrevida livre de recaída [351].

Aplasia eritroide pura congênita

Anemia de Diamond-Blackfan é um distúrbio das células primitivas da hematopoese, cuja primeira manifestação é aplasia eritroide pura. Mais tarde, podem surgir também neutropenia e trombocitopenia. A genética geralmente é autossômica dominante, mas, em algumas famílias, é recessiva. A condição decorre de mutação ou deleção de um número considerável de genes, todos codificando proteínas ribossômicas, entre os quais os mais implicados são *RPS19*, *RPS26* e *RPL11*. A expressão fenotípica das mutações é variável. Além da aplasia eritroide, há indivíduos nas famílias afetadas nos quais o gene mutante não tem efeitos aparentes; em outros, causa apenas macrocitose, aumento de atividade da adenosina desaminase eritrocítica, ou ambos. Há relato de anemia intrauterina tão grave a ponto de causar hidropisia fetal [352]. Cerca de 40% dos pacientes têm

anomalias congênicas associadas [353]. Há aumento de incidência de LMA [33].

A prevalência é da ordem de 5-7 em cada 100.000 nascidos vivos [353].

Hemograma

Inicialmente, há anemia e macrocitose, com baixa contagem de reticulócitos. A contagem de neutrófilos é normal ou um pouco reduzida; a contagem de plaquetas é normal ou aumentada. Com a progressão, podem surgir neutropenia e/ou trombocitopenia, evoluindo para pancitopenia.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a eritroblastopenia transiente da infância e com infecção persistente por parvovírus B19.

Exames adicionais

A dosagem de receptores solúveis de transferrina livres no soro mostra considerável redução em todos os tipos de aplasia eritroide pura. A atividade de adenosina desaminase nos eritrócitos está aumentada em 40 a 80% dos pacientes de síndrome de Diamond-Blackfan e é normal na eritroblastopenia transiente da infância [353]; entre pacientes com insuficiência genética da medula óssea, a especificidade é 95% [354]. A hemoglobina F pode estar aumentada. O exame da medula óssea mostra redução de proeritroblastos e extrema redução de eritroblastos mais tardios. Em uma minoria de pacientes, os proeritroblastos estão em número normal, faltando só os eritroblastos tardios. As células das demais linhagens estão inicialmente normais. Na eritroblastenia transiente, a hemoglobina A_{1c} pode estar aumentada, em consequência do aumento da idade média dos eritrócitos, e costuma ser normal na síndrome de Diamond-Blackfan, pois nesta o declínio da eritropoese foi muito gradual [355]. O diagnóstico pode ser confirmado por análise de DNA em cerca de 90% dos pacientes [356].

Aplasia eritroide pura adquirida

Aplasia eritroide pura adquirida é uma condição que pode ser transiente ou persistente. A transiente é em geral causada por infecção por parvovírus B19 e, a menos que o paciente tenha um encurtamento da sobrevida eritroide por outra causa (p. ex., esferocitose), é tão breve que, em geral, passa sem ser notada. Aplasia eritroide pura mais prolongada ocorre na eritroblastopenia pura transiente da infância, que resulta, em alguns casos, de infecção pelo herpes-vírus humano 6. Aplasia eritroide pura crônica pode decorrer da persistência de infecção por parvovírus B19 em pacientes com imunidade

deprimida, como na infecção por HIV e após tratamento imunossupressivo. Também pode ter origem imunológica, como nos casos associados a timoma, doença autoimune, leucemia de linfócitos grandes e granulares e a LLC. Muitos casos representam a manifestação mais proeminente de uma SMD.

Hemograma

Há anemia macrocítica ou normocítica caracterizada por extrema reticulocitopenia. Dependendo da etiologia, podem estar presentes aspectos displásicos em células de outras linhagens ou linfocitose, com linfócitos grandes e granulares. Em pacientes com anemia hemolítica subjacente, podem estar presentes esferócitos ou eliptócitos. Na eritroblastopenia pura transiente da infância, o VCM é normal; em até 20% dos casos, associa-se com neutropenia abaixo de $1 \times 10^3/\mu\text{L}$ e, em cerca de 5% dos casos, com trombocitopenia [357].

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as demais causas de anemias normocíticas e macrocíticas.

Exames adicionais

O exame da medula óssea é diagnóstico; a citologia por aspiração (mielograma) costuma ser suficiente. Dependendo do contexto clínico, outros exames podem incluir sorologia para herpes-vírus humano 6 e parvovírus B19, para o DNA do parvovírus, triagem para autoanticorpos, radiografia de tórax (para excluir timoma), imunofenotipagem de linfócitos e exame citogenético.

Poliglobulia*

É um aumento de E, Hb e Hct. Pode ser um aumento relativo – só no hemograma, não no paciente – decorrente de diminuição do volume plasmático, ou verdadeiro, causado por um aumento real do volume total da massa eritroide circulante.

Poliglobulia relativa

Poliglobulia relativa ou aparente, ou pseudopoliglobulia, pode decorrer de perda súbita de plasma, como em queimaduras extensas e na desidratação; a história mostra a causa óbvia, sendo desnecessários outros exames. A poliglobulia relativa também ocorre

como uma condição crônica, às vezes atribuída ao tabagismo, mas em geral sem uma explicação convincente. A distensão sanguínea mostra-se “abarrota” de eritrócitos; de resto, é normal. O hemograma não a diferencia da eritrocitose idiopática (ver a seguir); a distinção exige determinação radioisotópica do volume plasmático total e do volume globular total circulante, este em geral denominado “massa eritroide”. A dosagem de hemoglobina não diferencia entre poliglobulia verdadeira e poliglobulia relativa; mesmo uma Hb acima de 20 g/dL pode ser eventualmente observada em caso de poliglobulia relativa [358].

Poliglobulia verdadeira

Refere-se a um aumento da massa eritroide circulante, acima da prevista para a altura e o peso do paciente. O volume plasmático geralmente está aumentado, mas pode ser normal ou diminuído. Poliglobulia verdadeira resulta de:

1. Hipoxia crônica, como a causada pela vida em altitudes elevadas, por doença cardíaca cianótica e por hipoxia crônica por doença pulmonar.
2. Aumento inapropriado de secreção de eritropoetina, por exemplo, por cistos e tumores renais ou outros tumores.
3. Eritrocitose idiopática (uma condição não esclarecida).
4. Policitemia vera.

Todas essas condições causam aumento de E, Hb e Hct e uma distensão sanguínea de aspecto abarrotado. Com exceção da policitemia vera, discutida a seguir, os demais aspectos do hemograma são normais.

Policitemia vera

Policitemia vera (PV), também conhecida como policitemia rubra vera e policitemia proliferativa primária, é uma neoplasia mieloproliferativa (NMP) na qual há um aumento da produção de eritrócitos e, na maioria das vezes, também de granulócitos e plaquetas. A PV é uma doença da população de meia-idade e idosa, embora sejam vistos casos ocasionais em adultos mais jovens e casos raríssimos em crianças. Há aspectos clínicos resultantes da hiperviscosidade do sangue policitêmico, como acidentes cerebrovasculares e gangrena periférica, e aspectos indicativos da NMP em si, como hepatomegalia, esplenomegalia e prurido. Pode apresentar-se, também, por trombose de veias esplâncnicas ou síndrome de Budd-Chiari, com a mieloproliferação ainda oculta. Trombocitose com Hb e Hct

*N. de T. No original em inglês, o termo usado é *polycythaemia* (policitemia); no Brasil, prefere-se “poliglobulia”, reservando-se “policitemia” para designar a neoplasia mieloproliferativa “policitemia vera”.

normais pode representar uma PV oculta ou pré-policitemia.

A PV pode evoluir para uma fase de “exaustão medular” (*burn-out phase*) ou complicar-se pelo desenvolvimento de mielofibrose pós-policitemica ou de LMA.

Hemograma

Na poliglobulia de qualquer etiologia, a distensão sanguínea mostra um aspecto de “distensão abarrotada” (*packed film*), uma vez que a viscosidade do sangue torna-a mais espessa do que a distensão normal (Figura 8.91). A contagem global de leucócitos e as contagens de neutrófilos e de basófilos estão aumentadas na maioria dos casos. Leucocitose acima de $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ correlaciona-se com maior risco de trombose [359] e leucocitose acima de $13 \times 10^3/\mu\text{L}$,

com pior sobrevida global [360]. Aumento das contagens de eosinófilos e de monócitos é menos frequente. A contagem de plaquetas está elevada em cerca de dois terços dos casos e, também, o tamanho das plaquetas. Podem estar presentes, em pequeno número, eritroblastos e precursores granulocíticos no sangue periférico. Os eritrócitos costumam ser normocíticos e normocrômicos, ou, hipocrômicos e microcíticos se a eritropoese hiperplástica levar ao esgotamento das reservas de ferro. Quando ocorre deficiência de ferro, pode até haver anemia (Figura 8.92), mas a policitemia subjacente é revelada se o paciente for tratado com ferro. Raramente, a PV pode ser mascarada por outra complicação, como a deficiência de vitamina B₁₂ ou de folato.

O eritrograma mostra aumento de E, Hb e Hct, com VCM e HCM normais ou reduzidos. No início

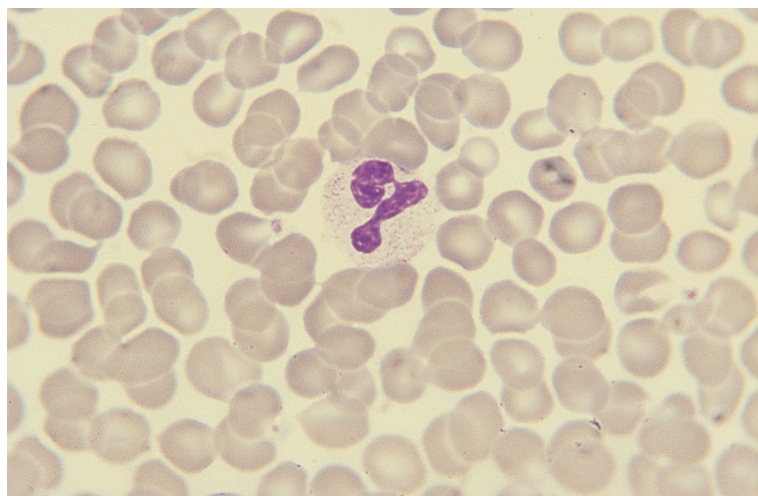


FIGURA 8.91 Distensão “abarrotada” resultante de poliglobulia pós-transplante, com Hb 20 g/dL e Hct 59%. O VCM aumentou para 114 fL, como consequência de tratamento com azatioprina.

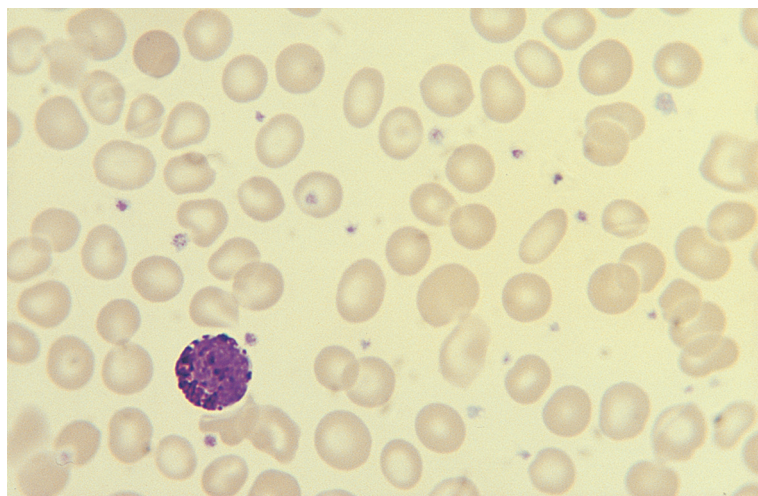


FIGURA 8.92 Distensão sanguínea de paciente com PV complicada por deficiência de ferro, mostrando anemia e trombocitose, além de algumas células hipocrômicas e microcíticas. Havia basofilia, com um basófilo presente no campo. As contagens (Coulter S Plus IV) foram: leucócitos $6,7 \times 10^3/\mu\text{L}$, E $4,38 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 10,6 g/dL, Hct 33%, VCM 75 fL, HCM 24,2 pg, CHCM 32,3 g/dL, RDW 24,9%, plaquetas $1,056 \times 10^6/\mu\text{L}$.

do curso da doença, pode haver aumento da massa eritroide sem, contudo, haver ainda aumento das cifras periféricas [361]. A contagem de plaquetas pode estar aumentada, às vezes sem haver ainda aumento da Hb; o VPM está elevado em relação ao número de plaquetas. Na PV complicada por deficiência de ferro, os valores do eritrograma são muito semelhantes aos do traço talassêmico, salvo pela CHCM diminuída e pelo RDW aumentado.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação é feita com as demais causas de poliglobulia (ver Tabela 6.1). É necessário distingui-la da eritrocitose essencial. Esse termo aplica-se a casos nos quais há poliglobulia inexplicada, mas faltam evidências claras, clínicas e laboratoriais, de NMP; em alguns desses pacientes, são evidenciados atualmente sinais moleculares de PV, de modo que esse diagnóstico torna-se cada vez mais raro.

Os achados de neutrofilia, basofilia, trombocitose, plaquetas gigantes e VPM elevado favorecem o diagnóstico de PV. O aumento da contagem de basófilos é particularmente útil no diagnóstico diferencial, já que não é visto em poliglobulias secundárias.

Exames adicionais

Deve-se confirmar a poliglobulia obtendo-se outra amostra de sangue, com mínima estase – sem o uso de garrote – antes de dar início a novas investigações. Deve ser feita dosagem sérica de eritropoetina; costuma estar diminuída, enquanto na poliglobulia relativa geralmente é normal. Uma eritropoetina baixa tem alta especificidade mas apenas moderada sensibilidade [362], sendo normal em 20% dos pacientes à apresentação em uma série [361]. Deve-se notar a que 30-50% dos pacientes com trombocitemia essencial (TE) mostram eritropoetina sérica diminuída [362, 363], o que torna a dosagem inútil para o diagnóstico diferencial entre as duas condições; um nível baixo também é visto na eritrocitose idiopática [364]. Determinação da volemia, eritroide e plasmática, com radioisótopos exclui a pseudopoliglobulias, mas este não é mais um teste de primeira linha. A classificação de NMPs da OMS (2008) sugere dispensar essa determinação isotópica em casos com hemoglobina acima de 18,5 g/dL (em homens) e 16,5 g/dL (em mulheres) [365], embora em uma comparação entre poliglobulia verdadeira e relativa, a Hb tenha excido esses níveis em 14% dos homens e 35% das mulheres com poliglobulia relativa [358]. Um limiar mais baixo de Hb (> 17 g/dL para homens e > 15 g/dL para mulheres) pode ser aceito desde

que a Hb do paciente tenha aumentado em 2 g/dL ou mais em relação a exames anteriores documentados [365]. Também foi sugerido que a determinação da volemia eritroide é desnecessária se o Hct for > 52%, mas deverá ser feita se o Hct for > 48% em homens ou > 45% em mulheres [366]. As diretrizes do British Committee for Standards in Hematology sugerem que a confirmação da policitemia não é necessária se o Hct for > 60% em homens e > 56% em mulheres [364]. Quando há suspeita diagnóstica mas os níveis de Hct e Hb não ultrapassam os critérios diagnósticos, uma biópsia de medula óssea pode ser usada como alternativa para o exame radioisotópico. O exame histológico do material de biópsia não só confirma o diagnóstico de NMP como permite, pela morfologia dos megacariócitos, distinguir entre TE e PV em fase pré-policitemica; deve ser suplementada por análise citogenética, pois uma anormalidade cromossômica clonal é confirmatória de neoplasia hematológica. A pesquisa da mutação *JAK2* V617F por análise molecular deve ser feita no sangue periférico; é positiva na grande maioria de pacientes com PV e em um quarto a um terço é homozigótica. A detecção confirma tratar-se de uma NMP, mas não distingue PV de TE. Se *JAK2* V617F não for detectada, deve ser procurada uma mutação do éxon 12 de *JAK2*. A vitamina B₁₂ sérica está geralmente elevada como resultado do aumento das proteínas de ligação de B₁₂. O crescimento independente de eritropoetina de colônias eritroides do sangue periférico ou da medula óssea sugere PV, embora uma fração significativa de casos de eritrocitose idiopática também mostre esse fenômeno; por ser elaborado, o teste não tem emprego amplo; a criação de um método simplificado poderia torná-lo mais difundido [367]. O escore de fosfatase alcalina dos neutrófilos (LAP) em geral está aumentado, o que é incomum nos casos de poliglobulia secundária; o teste torna-se sem importância diagnóstica se análise molecular estiver disponível.

Poliglobulias secundárias

O diagnóstico de poliglobulia secundária geralmente pode ser feito pela interpretação do hemograma à luz do caso clínico. Se a distinção com a PV não for óbvia, serão indicados os exames descritos no tópico anterior. Alguns pacientes com poliglobulia secundária podem ter neutrofilia ou trombocitose, mas um aumento da contagem de basófilos (confirmada pela observação ao microscópio) e a presença de plaquetas gigantes são muito sugestivos de PV. Uma eritropoetina sérica elevada tem alta

especificidade, mas é observada somente em 50% dos casos; pacientes ocasionais podem até mostrar baixa eritropoetina [362].

Exames adicionais

Deve ser feita gasometria arterial para identificar causas pulmonares de poliglobulia secundária. Há indicação de ecografia ou tomografia computadorizada para detectar lesões renais relevantes; também é útil para notar esplenomegalia, quando discreta.

Poliglobulia relativa (pseudopoliglobulia)

Costuma ser assintomática e notada em hemograma solicitado por outro motivo.

Hemograma

Há aumento de E, Hb e Hct. As demais contagens são normais. Pode ser notado o aspecto “abarrota-do” da distensão pela viscosidade excessiva do san-gue; não há outras alterações à microscopia.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a poliglobulia verdadeira, espe-cialmente com a eritrocitose essencial.

Exames adicionais

A distinção da poliglobulia verdadeira é feita pela determinação radioisotópica da volemia plasmática e globular. O exame da medula óssea por aspira-ção e biópsia é normal [368], mas desnecessário se as determinações volêmicas forem esclarecedoras. Não se detecta mutação em *JAK2*. A eritropoetina sérica é geralmente normal, mas às vezes é baixa [362, 368].

Distúrbios das plaquetas

Trombocitopenia

Trombocitopenias congênita e neonatal

Trombocitopenia congênita é um distúrbio que pode ser herdado ou decorrente de processo patoló-gico durante a vida intrauterina, como infecção ou exposição a um anticorpo ou a uma substância tó-xica. A trombocitopenia pode ser causada por falta de produção, aumento de consumo ou destruição de plaquetas. Trombocitopenia neonatal pode de-correr de eventos intrauterinos ou neonatais [369].

Trombocitopenia congênita pode ser uma anor-malidade isolada ou pode ser associada a anormali-dades da granulocitopoese e/ou eritropoese, a ano-malias constitucionais ou a imunodeficiência. Na trombocitopenia amegacariocítica congênita re-sultante de mutação no gene *MPL* (o receptor de trombopoetina), há uma progressão lenta para pan-citopenia [370]. A rara síndrome de trombocitope-nia amegacariocítica com sinostose radioulnar, re-sultante da mutação *HOXA11*, pode progredir para anemia hipoplástica ou pancitopenia [371, 372]. Pacientes com anemia de Fanconi também podem apresentar-se com trombocitopenia isolada, só mais tarde mostrando progressão para pancitopenia. Sí-n-drome de Wiskott-Aldrich, uma síndrome de he-rança ligada ao sexo, resultante de mutação no ge-ne *WAS*, caracteriza-se por microtrombocitopenia, eczema, imunodeficiência e, às vezes, neutrope-nia; mulheres heterozigóticas às vezes são afeta-das. A síndrome de Wiskott-Aldrich pode compli-car-se de uma trombocitopenia grave, refratária e

TABELA 8.11 Anormalidades hereditárias e constitucionais que causam trombocitopenia com plaquetas pequenas [373-377]

Defeito	Herança	Defeito funcional das plaquetas	Anormalidades associadas	Referências
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Recessiva ligada ao sexo* (gene <i>WAS</i> em Xp11.23)	Sim (redução dos grânulos densos e expressão reduzida de GpIb/IIIa e IV)	Eczema e defeito da imunidade celular	[374, 375]
Trombocitopenia ligada ao sexo, incluindo trombocitopenia intermitente ligada ao sexo com plaquetas pequenas	Recessiva ligada ao sexo (gene <i>WAS</i> em Xp11.23)	Sim (redução dos grânulos densos e expressão reduzida de GpIb/IIIa e IV)	Trombocitopenia isolada (embora haja mutação no mesmo gene que causa a síndrome de Wiskott-Aldrich)	[375, 376]
Trombocitopenia autossômica dominante com microplaquetas	Autossômica dominante	Não (função normal)		[377]

*Há casos ocasionais em mulheres, ou por lionização tendenciada ou por falha no mecanismo que assegura que, em heterozigotos, haja proliferação/sobrevida preferenciais de células que expressam o gene *WAS wild* paterno [374].

TABELA 8.12 Anormalidades hereditárias e constitucionais que causam trombocitopenia com plaquetas de tamanho normal [373, 378-392]

Defeito	Herança	Defeito funcional das plaquetas	Anormalidades associadas	Referências
Anemia de Fanconi	AR		Progressão para pancitopenia; estatura reduzida, dedos anormais e outros aspectos dismórficos	
Trombocitopenia com rádios ausentes	AR devida à co-herança de um polimorfismo não codificante e um alelo nulo de <i>RBM8A</i> em 1q21.1; raramente AD		Rádios ausentes, às vezes outras anormalidades, trombocitopenia melhora com a idade; alguns casos desenvolveram leucemia aguda	
Trombocitopenia amegacariocítica	AR, mutação no gene <i>MPL</i> (codificando o receptor de trombopoetina) em 1p34.2		Lenta progressão para anemia aplástica, propensão a SMD e LMA	[371, 372, 379, 380, 381]
Trombocitopenia amegacariocítica com sinostose radioulnar	AD, gene <i>HOXA11</i> em 7p15.2		Fusão radioulnar (sinostose); progressão para anemia aplástica, possível surdez sensorio-neural	[371, 372, 380]
Trombocitopenia autossômica dominante	AD, gene <i>MASTL</i> (previamente <i>FLJ14813</i>) em 10p12.1			[382]
Trombocitopenia autossômica dominante com plaquetas de coloração pálida	AD, <i>ANKRD26</i> em 10p12.1	Sem defeito consistente; glicoproteína Ia e grânulos α podem estar reduzidos	Pode haver leucocitose e Hb alta; propensão à LMA	[383, 384, 385]
Distúrbio plaquetário familiar com propensão a desenvolver LMA	AD, <i>RUNX1</i> em 21q22.12, haploinsuficiência ou mutação negativa dominante	Função muito anormal, defeito de armazenamento e agregação muito diminuída com todos os agonistas	Propensão ao desenvolvimento de LMA	[386]
Distúrbio plaquetário Quebec (antes denominado fator V Quebec)	AD, ganho ou mutação funcional em PNAN em 10q22.2, codificando a uroquinase ativadora do plasminogênio	Agregação anormal com epinefrina, sangramento retardado; agregometria Lumi falsamente normal		[387]
Trombocitopenia dismegacariopoética	AR	Número normal ou aumentado de megacariócitos pequenos e dismórficos		[388]
Trombocitopenia autossômica dominante leve	AD, mutação de <i>CYCS</i> em 7p15.3, codificando citocromo C mitocondrial	Liberção prematura de plaquetas nos espaços medulares em vez de nos sinusoides		[389]
Trombocitopenia autossômica dominante com anisocitose plaquetária	AD, mutação do gene <i>ITGB3</i> , codificando a glicoproteína plaquetária IIIa, em 17q21.32	Agregação diminuída com ADP e colágeno, normal com ristocetina		[390]
Trombocitopenia leve em heterozigotos de uma família da Micronésia	AD, mutação ou deleção de <i>THPO</i> em 3q27.1		Anemia aplástica em homozigotos	[391]
Trombocitopenia de Paris-Trousseau	Uma síndrome de genes contíguos devida a microdeleção de 11q23-24; deleção de <i>FLI1</i> em 11q24.3 é responsável pela trombocitopenia	Plaquetas com grânulos α anormalmente grandes e, às vezes, com deficiência de grânulos densos; a contagem de plaquetas melhora com a evolução	Aspectos da síndrome de Jacobsen: retardo psicomotor, dismorfismo facial e defeitos cardíacos	[379, 381, 392]
Trombocitopenia relacionada a <i>ACTN1</i>	AD, mutação em <i>ACTN1</i> , em 14q24			[385]

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, síndrome mielodisplásica.

TABELA 8.13 Anormalidades hereditárias e constitucionais que causam trombocitopenia com plaquetas grandes [172, 343, 344, 378, 379, 393-414]

Defeito	Herança	Defeito funcional das plaquetas	Anormalidades associadas	Referências
Síndrome de Bernard-Soulier	AR, homozigose ou heterozigose composta para mutações no gene <i>GP1BA</i> (17p13.2), gene <i>GP1BB</i> (22q11.21) ou gene <i>GP9</i> (3q21.3)	Complexo de glicoproteínas Ib/IX/V anormal, com defeito acentuado da agregação plaquetária dependente de fator von Willebrand e induzida por ristocetina	Nenhuma	
Síndrome de Bernard-Soulier monoalélica; plaquetas grandes com ou sem trombocitopenia	AD, mutações negativas dominantes nos genes <i>GP1BA</i> (17p13.2) ou <i>GP1BB</i> (22q11.21)	Geralmente normal; agregação induzida por ristocetina às vezes reduzida	Nenhuma	[381, 385, 393, 394]
Síndromes de DiGeorge e velocardiofacial	AD, uma síndrome de genes contíguos devida a microdeleção; perda do gene <i>GP1BB</i> em 22q11.21	Portadores da síndrome de Bernard-Soulier, com plaquetas grandes e diminuição da agregação induzida por ristocetina; ocorre síndrome de Bernard-Soulier quando há mutação no outro alelo <i>GP1BB</i>	Anormalidades cardíacas, da paratireoide e do timo, retardo cognitivo na síndrome velocardiofacial e dismorfismo facial; citopenias autoimunes	[381, 395]
Macrotrombocitopenia devida à mutação <i>ITGB3</i>	AD, mutação ativadora do gene <i>ITGB3</i> , codificando glicoproteína plaquetária IIIa, em 17q21.32	Normal		[396]
Macrotrombocitopenia devida à mutação <i>ITGA2B</i> *	AD, mutação ativadora do gene <i>ITGA2B</i> , codificando glicoproteína plaquetária IIb, em 17q21.31	Agregação diminuída com ADP e colágeno		[397]
Estomatocitose mediterrânea/ macrotrombocitopenia (fitosterolemia)	AR, mutação nos genes <i>ABCG5</i> em 2p21 ou <i>ABCG8</i> em 2p21	Agregação anormal com ristocetina; anormalidades variáveis com outros agonistas	Baixa estatura, hiperfitosterolemia, hipercolesterolemia variável	[172]
Síndrome das plaquetas cinzentas	AR, mutação no gene <i>NBEAL2</i> em 3p21.31; heterozigotos têm plaquetas grandes e número reduzido de grânulos α	Defeito dos grânulos α com plaquetas hipogranulares e leve defeito funcional; deficiência combinada de grânulos α e δ	Neutrófilos acentuadamente hipogranulares em algumas famílias [398]; mielofibrose e esplenomegalia	[398]
Trombocitopenia relacionada a <i>GFI1B</i>	AD devida à mutação de <i>GFI1B</i> em 9q34.13 (2 famílias)	Defeito dos grânulos α	Anisocitose e pecilocitose em 1 família	[385]
Síndrome das plaquetas brancas	AD	Defeito dos grânulos α, aparelho de Golgi proeminentes, agregação defeituosa com adrenalina e ADP		[399]
Síndrome de artrogripose, disfunção renal e colestasia (ARC)	AR, <i>VPS33B</i> em 15q26.1 ou <i>VIPAR</i> em 14q24.3	Contagem de plaquetas normal ou leve trombocitopenia, plaquetas grandes e pálidas, proteínas dos grânulos α diminuídas	Contraturas articulares, acidose tubular renal, colestasia	

(continua)

TABELA 8.13 (Continuação) Anormalidades hereditárias e constitucionais que causam trombocitopenia com plaquetas grandes [172, 343, 344, 378, 379, 393-414]

Defeito	Herança	Defeito funcional das plaquetas	Anormalidades associadas	Referências
Síndrome plaquetária York	Desconhecida		Trombocitopenia e miopatia mitocondrial, perda variável de grânulos α e δ , organelas gigantes eletrodensas nas plaquetas	[400]
Síndrome de plaquetas gigantes de Medich	Desconhecida	Plaquetas grandes e agranulares com ultraestrutura característica		
Doença relacionada a <i>MYH9</i> : anomalia de May-Hegglin	AD, <i>MYH9</i> (gene da cadeia pesada 9 da miosina não muscular) em 22q12.3	Complexo de glicoproteínas Ib/IXV reduzido	Inclusões nos neutrófilos	[401, 402]
Doença relacionada a <i>MYH9</i> : síndrome de Fechtner	AD, <i>MYH9</i> em 22q12.3	Glicoproteínas Ib/IXV podem estar diminuídas	Inclusões nos neutrófilos, síndrome semelhante à de Alport – nefrite, surdez sensorio-neural, cataratas	[378, 403, 404]
Doença relacionada a <i>MYH9</i> : síndrome de Epstein	AD, <i>MYH9</i> em 22q12.3	Glicoproteínas Ib/IXV podem estar diminuídas	Síndrome semelhante à de Alport – nefrite, surdez sensorio-neural, cataratas –, mas sem inclusões nos neutrófilos	[378, 404]
Doença relacionada a <i>MYH9</i> : síndrome de Sebastian	AD, <i>MYH9</i> em 22q12.3	Complexo de glicoproteínas Ib/IXV reduzido	Inclusões nos neutrófilos	[401, 403, 404]
Anomalia de Pelger-Huët homozigótica	AD, gene <i>LBR</i> em 1q42.12		Falta de lobulação dos granulócitos e monócitos; retardo de desenvolvimento, epilepsia, anormalidades esqueléticas em algumas famílias	[405]
Trombocitopenia ligada ao sexo, com eritropoese anormal (ocasionalmente uma síndrome leve em mulheres heterozigóticas)	Ligada ao sexo, mutação em <i>GATA1</i> em Xp11.23	Plaquetas cinzentas – redução de grânulos α , glicoproteínas Ib β e IX anormais, agregação induzida por ristocetina anormal, defeito funcional pode ser grave	Macrocitose, diseritropoese ou anemia diseritropoética em algumas famílias, β -talassemia em algumas famílias, ocasionalmente porfiria eritropoética congênita	[343, 344, 379, 406, 407]
Trombocitopenia com neutropenia	Desconhecida, mas provavelmente hereditária	Glicoproteína Ib reduzida	Neutropenia, com sialil-Lewis X reduzido nos neutrófilos	[408]
Trombocitopenia com plaquetas grandes em Bengala Ocidental, Bangladesh, Butão e Nepal (síndrome plaquetária de Harris)	Desconhecida	Normal		[409]
Plaquetas gigantes e insuficiência mitral	Desconhecida	Glicoproteínas Ia, Ic e IIa reduzidas, agregação com ADP e adrenalina reduzidas	Insuficiência mitral	[410]

(continua)

TABELA 8.13 (Continuação) Anormalidades hereditárias e constitucionais que causam trombocitopenia com plaquetas grandes [172, 343, 344, 378, 379, 393-414]

Defeito	Herança	Defeito funcional das plaquetas	Anormalidades associadas	Referências
Plaquetas gigantes com trombopoese ineficaz	AD	Glicoproteínas plaquetárias Ib e IIb/IIIa aumentadas	Nenhuma	[411]
Doença de von Willebrand do tipo plaquetário	AD, <i>GP1BA</i> (codificando Gplbα) em 17p13.2	Agregação com ristocetina aumentada		
Doença de von Willebrand tipo IIb (incluindo “síndrome plaquetária Montreal”)	AD, mutação com ganho de função de <i>VWF</i> em 12p13.31	Agregação espontânea de plaquetas em repouso ou sob agitação	Raramente, agregados plaquetários no sangue circulante	[412]
Macrotrombocitopenia devida à mutação <i>TUBB1</i>	AD, <i>TUBB1</i> em 20q13.32	Tubulina β1 em nível 50% do normal		[413]
Macroplaquetas com ou sem trombocitopenia	Dominante ligada ao sexo, <i>FLNA</i> em Xq28	Interação diminuída do fator von Willebrand com as glicoproteínas plaquetárias	Defeito plaquetário isolado ou associado com heterotopia nodular periventricular	[414]

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva.
*É provável que homozigose cause uma síndrome semelhante à trombastenia de Glanzmann.

TABELA 8.14 Causas de trombocitopenia neonatal (as mais comuns estão em negrito) (modificada da referência 369)

Começo dentro das primeiras 24 horas de vida	Começo após 72 horas de vida
Hipoxia fetal crônica	Sepse neonatal
Asfixia perinatal	Enterocolite necrosante
Infecção bacteriana perinatal	Infecção congênita
Trombocitopenia aloimune	Trombocitopenia autoimune materna
Trombocitopenia autoimune materna	Síndrome de Kasabach-Merritt
Infecção congênita (toxoplasmose, citomegalovirose, HIV, rubéola)	Distúrbios metabólicos congênitos
Trombose da aorta ou da veia renal	Trombocitopenias hereditárias (trombocitopenia com ausência dos rádios ausentes, trombocitopenia amegacariocítica congênita)
Leucemia congênita	
Síndrome de Kasabach-Merritt	
Distúrbios metabólicos congênitos	
Trombocitopenias hereditárias (trombocitopenia com rádios ausentes, trombocitopenia amegacariocítica congênita)	

provavelmente imunológica, com plaquetas até abaixo de $10 \times 10^3/\mu\text{L}$; quando isso ocorre precocemente, implica prognóstico reservado e imediata indicação de transplante [232]. Síndromes hereditárias e constitucionais causadoras de trombocitopenia estão resumidas nas Tabelas 8.11 a 8.13 e causas de trombocitopenia neonatal, na Tabela 8.14.

Outras causas de trombocitopenias congênicas foram descritas em apenas uma família ou em poucas famílias, como a macrotrombocitopenia autossômica dominante sem suscetibilidade a hemorragias e com glicosilação reduzida da glicoproteína IV plaquetária, aumento da agregação com ADP, epinefrina e colágeno e agregação induzida com ristocetina em concentrações inferiores à usual [415],

e a macrotrombocitopenia autossômica dominante, com agregação reduzida com adrenalina e ácido aracdônico, expressão plaquetária de glicoforina e perda de audição de começo tardio [416]. Trombocitopenia intermitente também foi descrita em paciente com neutropenia congênita severa resultante de mutação no gene *G6PC3* [417]. Deve-se notar que a síndrome de Bernard-Soulier é um distúrbio hemorrágico grave, com acentuada trombocitopenia e plaquetas gigantes com função anormal, enquanto a heterozigose para algumas mutações dominante-negativas causa uma forma mais leve da síndrome. As síndromes resultantes de mutações no gene *MHY9*, que codifica a cadeia pesada nove da miosina não muscular, diferem nos aspectos

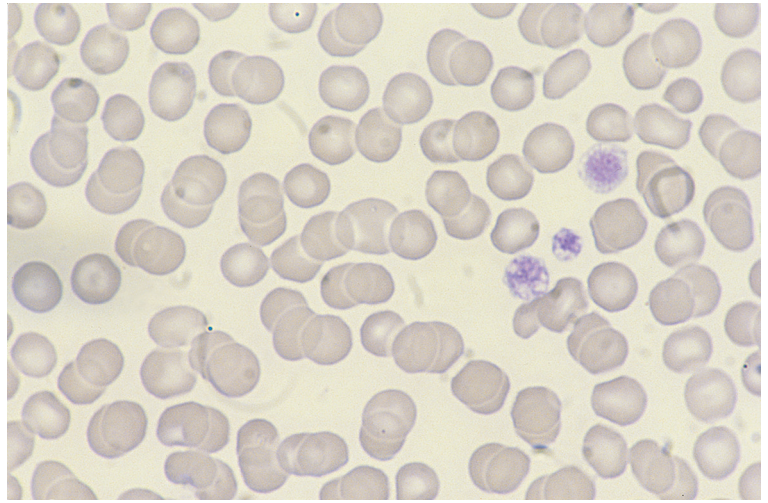


FIGURA 8.93 Distensão sanguínea de paciente com síndrome de Bernard-Soulier, mostrando trombocitopenia e três plaquetas gigantes.

associados e na ultraestrutura das inclusões dos neutrófilos [418]. Há outras raras síndromes congênitas em que foi descrita trombocitopenia. Na síndrome de von Voss-Cherstvoy ou DK-focomelia, há múltiplas anomalias congênitas, que podem estar associadas a trombocitopenia, com redução dos megacariócitos na medula óssea; é geralmente fatal no período perinatal [419]. Trombocitopenia congênita também foi associada à agenesia do corpo caloso e fácies característica [420]. Outra síndrome autosômica dominante associa deformidade do membro superior, perda de audição, oftalmoplegia externa e trombocitopenia [421]. Trombocitopenia fetal e congênita pode ser um aspecto de síndrome de Down, trissomia 13, trissomia 18, síndrome de Turner e triploidia [369].

Trombocitopenia congênita pode ser transiente e de origem imunológica, resultante da passagem transplacentária de autoanticorpos maternos ou aloanticorpos (incluindo antiglicoproteína IV – anti-CD36). Pode ser um aspecto da doença hemolítica Rh do feto e do recém-nascido quando grave [369]. A presença de outras anormalidades congênitas sugere uma síndrome hereditária ou a exposição a uma substância teratogênica *in utero*. A causa mais provável de trombocitopenia neonatal varia se o momento de aparição for anterior ou posterior a 72 horas de vida. A grande maioria de casos que surgem após 72 horas deve-se a enterocolite necrosante ou sepse [369].

Hemograma

O hemograma deve ser cuidadosamente examinado quanto aos dados numéricos, incluindo o VPM,

e a distensão sanguínea para a morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas; estas podem ser pequenas, do tamanho usual ou grandes. Plaquetas pequenas são vistas na rara síndrome de Wiskott-Aldrich (ver Figura 3.157). Plaquetas de tamanho normal são vistas quando há hipoplasia global ou megacariocítica pura da medula óssea. Plaquetas grandes são comuns em várias causas genéticas de trombocitopenia, como a síndrome de Bernard-Soulier (Figura 8.93) e as doenças relacionadas a *MYH9*, incluindo a anomalia de May-Hegglin (ver Figura 3.93) e várias outras condições mais raras. Na síndrome de Bernard-Soulier, há trombocitopenia acentuada com plaquetas gigantes. Na heterozigose para a síndrome de Bernard-Soulier, a contagem de plaquetas varia de $40\text{--}50 \times 10^3/\mu\text{L}$ a valores quase normais, mas todos têm plaquetas gigantes [393]. Na maioria dos distúrbios, as plaquetas têm granulações normais, mas, na rara síndrome das plaquetas cinzentas, as plaquetas são grandes e agranuladas ou hipogranuladas (Figura 8.94) e, na trombocitopenia de Paris-Trousseau (síndrome de Jacobsen), têm grânulos gigantes. Na trombocitopenia associada à mutação *GATA1*, há plaquetas grandes e hipogranulares [378].

Os neutrófilos devem ser examinados à procura de inclusões anormais, presentes em muitos casos, mas não invariavelmente, em um grupo heterogêneo de distúrbios, agora considerados em conjunto como doenças relacionadas a *MYH9* (anomalia de May-Hegglin, síndromes de Fechtner, Sebastian e Epstein). As inclusões podem ser fusiformes ou irregulares [418]. Essas inclusões decorrem da localização anormal de *MYH9* em associação com

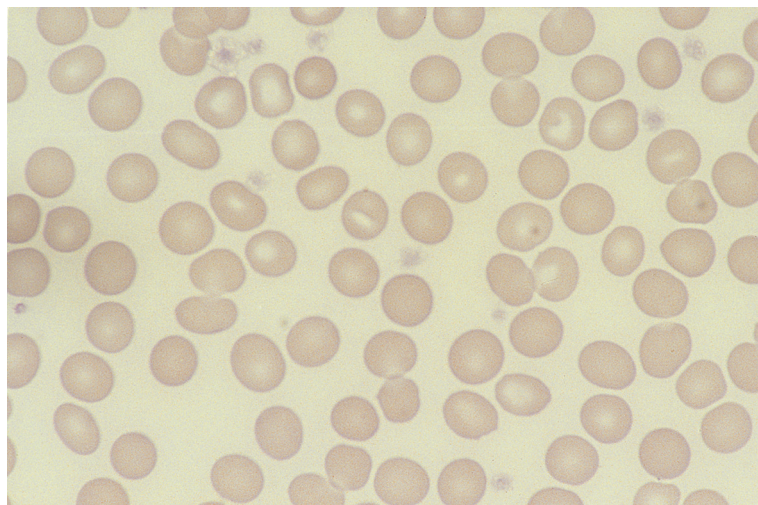


FIGURA 8.94 Distensão sanguínea de paciente com síndrome das plaquetas cinzentas, mostrando plaquetas agranuladas.

ribossomos [418, 422]. Em nível ultraestrutural, notam-se conglomerados de ribossomos, segmentos de retículo endoplasmático rugoso e filamentos longitudinais paralelos ou inclusões com estrias transversais [418, 423]. As inclusões nos neutrófilos nas doenças relacionadas a *MYH9* podem estar abaixo do nível de resolução da microscopia óptica, embora possam ser detectadas por imunofluorescência, para mostrar a distribuição de *MYH9*, ou por observação ultraestrutural [423]. Em outra rara síndrome congênita, a síndrome de Upshaw-Schulman, há trombocitopenia episódica associada a anemia hemolítica microangiopática; essa síndrome, que é responsiva a infusão de plasma, comprovou-se decorrer de deficiência congênita da protease que cliva o fator von Willebrand, ADAMTS13 [424].

Os eritrócitos devem ser examinados para anisocitose, pecilocitose e macrocitose, pois essas alterações podem ser indicativas de mutação no gene *GATA1*, que afeta tanto a eritropoese como a trombocitopoeia [344]. Em bebês com síndrome de Down, deve-se examinar a distensão sanguínea à procura de sinais da mielopoese anormal transitória (ver Capítulo 9), passível de provocar trombocitopenia. Raramente, em outros bebês trombocitopênicos, o hemograma pode evidenciar aspectos de leucemia congênita.

Note-se que em trombocitopenias fornecidas por contadores eletrônicos, se houver alta porcentagem de plaquetas muito grandes, o resultado pode estar falseado para menos, porque o volume destas pode ultrapassar o limiar superior definido para

o instrumento. Em um trabalho, notou-se que a subestimação da contagem é maior em contadores de impedância do que em contadores com base em dispersão de luz [425]. Dependendo da etiologia da trombocitopenia, o VPM pode estar baixo, normal ou aumentado. Nos distúrbios relacionados a *MYH9* e na síndrome de Bernard-Soulier, um VPM de 12,4 fL mostrou-se ser um *cut-off* adequado para distinguir essas trombocitopenias genéticas da púrpura trombocitopênica autoimune [425]. Nas trombocitopenias genéticas com plaquetas grandes, a porcentagem de plaquetas reticuladas é normal ou um pouco aumentada, enquanto na trombocitopenia autoimune, como regra, é consideravelmente aumentada [426].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui todas as causas de trombocitopenia congênita listadas nas Tabelas 6.27 e 8.11 a 8.13. Uma causa rara de trombocitopenia que pode ser confundida com a síndrome de Bernard-Soulier é a pseudossíndrome de Bernard-Soulier, resultante de um autoanticorpo antiglicoproteína plaquetária Ib, induzido por fármacos [427].

Exames adicionais

A necessidade e a escolha de exames adicionais dependem da etiologia suspeitada com base nos achados clínicos e no hemograma. Poderão ser úteis: exame dos antígenos de membrana das plaquetas por técnicas imunológicas, pesquisa de anticorpos aos antígenos do grupo Kell e anticorpos antiplaquetários específicos no soro materno,

exame da medula óssea, análise citogenética (para detecção de anomalias constitucionais ou alterações próprias de um clone leucêmico) e testes de função plaquetária (p. ex., demonstração de agregação apenas com ristocetina na síndrome de Bernard-Soulier). Investigação de outros membros da família também poderá ser útil. O exame ultraestrutural de plaquetas e neutrófilos às vezes é útil. Se houver suspeita de trombocitopenia aloimune feto-materna, os testes indicados são tipificação HPA no bebê e na mãe e investigação do soro materno para autoanticorpos antiplaquetas, geralmente anti-HPA-1a, mais raramente anti-HPA-5b [428]. Na suspeita de síndrome de Wiskott-Aldrich, é indicada uma avaliação da imunidade; o diagnóstico também pode ser confirmado por análise genética ou pela demonstração de ausência ou anormalidade da proteína WAS [429]. Na suspeita de doença de von Willebrand ou pseudodoença de von Willebrand, devem ser investigados os fatores de coagulação e a distribuição dos múltiplos do fator von Willebrand. Em pacientes com doença relacionada a *MYH9*, exame por imunofluorescência pode detectar inclusões nos neutrófilos, quando não são vistas à microscopia óptica; nesses pacientes, as inclusões não contêm RNA poliadenilado [430].

Púrpura trombocitopênica autoimune ("idiopática") (PTI)

Púrpura trombocitopênica autoimune ou "idiopática" (PTI) é uma condição adquirida, na qual a sobrevivência plaquetária é reduzida pela presença de autoanticorpos antiplaquetas. Também pode ocorrer trombocitopenia autoimune como parte de uma doença autoimune mais ampla, como o lúpus eritematoso sistêmico ou a rara síndrome autoimune/linfoproliferativa associada com deficiência de Fas [255]. Há um aumento de incidência na síndrome de DiGeorge. Trombocitopenia autoimune é uma complicação comum da leucemia linfocítica crônica e mais rara dos demais distúrbios linfoproliferativos. Em um trabalho, em 3 de cada 20 pacientes com PTI ou síndrome de Evans, demonstrou-se a presença de uma população de linfócitos com fenótipo de LLC, sugerindo que uma linfocitose B policlonal, da mesma forma que a LLC, pode predispor à PTI [229]. Em geral, tem sido aceito que a púrpura trombocitopênica autoimune idiopática é particularmente frequente em mulheres jovens, mas, em um levantamento prospectivo em base populacional [431], a incidência geral em adultos de

1,6 em cada 100 mil por ano, similar em homens e mulheres e foi maior acima da idade de 60 anos. Em outro levantamento, a incidência foi estimada em 8,1 em cada 100 mil por ano em crianças e 12,1/100.000/ano em adultos [432]. A incidência subiu com a idade e foi maior em mulheres do que em homens até a idade de 70 anos [432].

Hemograma

A distensão sanguínea confirma a trombocitopenia da contagem do instrumento e, a menos que o início seja muito agudo, faz notar plaquetas de tamanho aumentado (Figura 8.95). De modo geral, as outras linhagens celulares são normais, mas, ocasionalmente, há AHAI (síndrome de Evans) associada ou evidência de uma condição causal subjacente, como LLC, linfoma ou leucemia de linfócitos grandes e granulados.

Há trombocitopenia e, salvo nos casos muito agudos, aumento do VPM e da amplitude distribuição das plaquetas (PDW). A porcentagem de plaquetas reticuladas (ver Capítulo 2) costuma ser consideravelmente elevada; não há certeza se esse dado é mesmo útil para distinguir trombocitopenias por excessiva destruição de trombocitopenias por falta de produção, pois há resultados conflitantes em trabalhos publicados [426, 433].

Em casos de PTI aguda na infância, menos de 20% desenvolvem doença crônica [434]. Quanto mais baixa a contagem de plaquetas inicial, menor a probabilidade de evolução como PTI crônica [434].

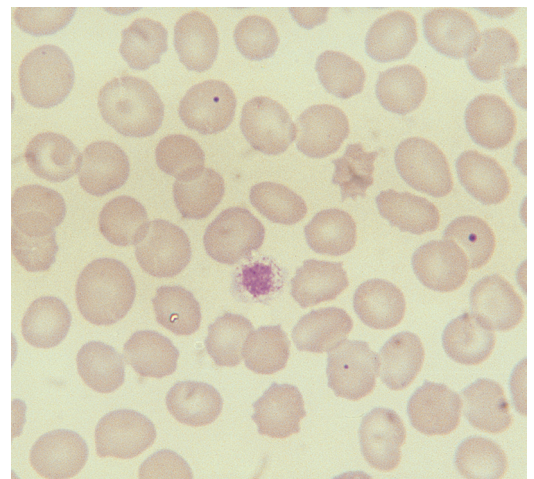


FIGURA 8.95 Distensão sanguínea de paciente com PTI, após esplenectomia, mostrando trombocitopenia, uma única plaqueta gigante, corpos de Howell-Jolly e um acantócito.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui trombocitopenia secundária a rubéola e outras viroses, púrpura trombocitopênica induzida por drogas e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). Citomegalovirose, mononucleose infecciosa e outras infecções virais também podem apresentar-se com trombocitopenia severa como principal manifestação. A trombocitopenia sintomática pode ser o aspecto de apresentação da infecção por HIV. Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é comum em pacientes com os critérios que correspondem ao diagnóstico de PTI, de modo que o teste para HCV é indispensável; casos relacionados à hepatite C frequentemente têm crioglobulinemia e anticorpos anticardiolipina [435]. A infecção por *Helicobacter pylori* tem sido relacionada a casos típicos de PTI; em alguns casos, há elevação da contagem de plaquetas com a eliminação do *helicobacter*, mas a frequência desse resultado favorável não está definida. É muito importante excluir trombocitopenia congênita, algumas vezes diagnosticada erroneamente como PTI e, inclusive, inapropriadamente tratada.

Exames adicionais

Antes de realizar qualquer outra investigação, deve-se examinar a distensão sanguínea para confirmar a trombocitopenia, e, a menos que o paciente apresente manifestações purpúricas evidentes, deve-se refazer a contagem em uma segunda amostra de sangue cuidadosamente coletada. O exame da distensão sanguínea é fundamental: deve-se procurar esferócitos, eritrócitos fragmentados, policromatocitose, linfócitos atípicos, blastos, células linfomatosas e depósitos de crioglobulina. Aspectos específicos de trombocitopenia congênita devem ser cuidadosamente pesquisados nas plaquetas e nos leucócitos. Dependendo da suspeita diagnóstica, oriunda dos achados clínicos e do hemograma, outros exames poderão ser indicados. Por exemplo, se o diagnóstico mais condizente for de fato PTI, não costuma haver indicação de exames adicionais. Em adultos, entretanto, um exame da medula óssea deve ser considerado, se (i) houver qualquer aspecto atípico no hemograma, (ii) o paciente tiver mais de 60 anos, (iii) houver recaída, ou (iv) a esplenectomia for considerada [436]. De modo similar, será indicado mielograma em casos pediátricos, quando (i) houver aspectos atípicos, (ii) houver recaída, ou (iii) houver necessidade de tratamento com corticoide [436]. Devem ser feitos

testes para anticorpos antinucleares e anti-DNA, já que a PTI pode ser a apresentação inicial do lúpus eritematoso sistêmico; a presença de anticorpos antifosfolípido sustenta esse diagnóstico. Quando são vistos linfócitos atípicos, são úteis o monoteste para a mononucleose infecciosa e a sorologia específica para vírus de Epstein-Barr (EBV) e CMV; quando há suspeita de infecção por HIV, deve-se fazer um teste específico para esse fim. A pesquisa de anticorpos anti-HCV é indispensável, principalmente em países com alta incidência de hepatite C [437], pois esse diagnóstico tem implicações terapêuticas. A pesquisa de *H. pylori* deve ser considerada, principalmente em países com alta prevalência, como a Itália e o Japão;* não é certa, entretanto, a utilidade do exame, já que há resultados conflitantes quanto à melhora obtida com o tratamento de erradicação [438, 439]; o British Committee for Standards in Haematology (BCSH) recomenda testar pacientes que recaem [436]. Na presença de eritrócitos fragmentados, deve-se investigar, com urgência, a possibilidade de PTT.

Púrpura trombocitopênica imunológica pós-infecciosa

Púrpura trombocitopenia imunológica, em tudo semelhante à púrpura trombocitopênica autoimune, pode ser desencadeada por várias infecções (como rubéola) e após vacinações variadas (para rubéola, *influenza*, sarampo, hepatite B, poliomielite, parotidite e a tríplice para difteria, poliomielite e tétano) [440]. Esse tipo de púrpura trombocitopênica pós-infecciosa é particularmente comum em crianças.

Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT)

A PTT é um grave distúrbio sistêmico; geralmente resulta de autoanticorpos para ADAMTS13 (protease de clivagem do fator von Willebrand), na qual microtrombos em múltiplos órgãos causam consumo de plaquetas, fragmentação dos eritrócitos e manifestações renais e cerebrais. A trombocitopenia pode provocar manifestações hemorrágicas. Uma minoria de casos sucede infecções por *Escherichia coli* O157:H7 [441] ou pneumonia dos Legionários. Pode ocorrer PTT no decurso de infecção por HIV, e haver recaída em caso de interrupção de tratamento antirretroviral eficaz [442]. Tratamento com ticlopidina [443] e com clopidogrel podem causar PTT; casos raros foram relacionados ao uso de cocaína ou *ecstasy* [444] ou ao tratamento com interferon [445].

*N. de T. Também no Brasil.

A incidência tem sido variavelmente estimada em 1, 1,7, 3,7 e 3,8 em cada 1 milhão por ano [314, 446]. Há um conjunto de cinco sinais clássicos da PTT: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, insuficiência renal, sintomas neurológicos e febre. Como o tratamento com plasmáfere-se é urgente, deve ser iniciado de imediato se um paciente se apresentar com trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática e não houver outra explicação evidente [277].

Hemograma

A distensão sanguínea mostra sinais de anemia hemolítica microangiopática (fragmentação e policromatofilia), junto com trombocitopenia e anisocitose plaquetária. A presença de eritrócitos fragmentados acima de 1% deve ser considerada altamente sugestiva de PTT [447]. Entretanto, eles podem ser escassos nos primeiros dias da doença [314] ou mesmo ausentes [448], de modo que, se houver suspeita consistente de PTT, devem ser cuidadosamente pesquisados em hemogramas repetidos e deve ser feita dosagem de ADAMST13. RDW, VPM e PDW podem estar aumentados. A porcentagem de plaquetas reticuladas também costuma estar aumentada. Uma vez iniciado o tratamento, a contagem de plaquetas é o melhor exame para monitorar os resultados e a progressão [277].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui outras causas de fragmentação eritrocitária, particularmente as que também podem causar trombocitopenia. Deve ser considerada a possibilidade de PTT familiar (síndrome hemolítico-urêmica atípica).

Exames adicionais

PTT é geralmente decorrente de um anticorpo para a protease de clivagem do fator von Willebrand (ADAMST13); o teste definitivo é a dosagem, que mostra ADAMST13 abaixo de 10% da atividade normal. A pesquisa do anticorpo respectivo pode ser feita em pacientes com uma concentração reduzida. A confirmação histológica da presença de trombos capilares por biópsia confirma o diagnóstico, mas geralmente não é mais indicada. Teste para HIV é indispensável, já que a PTT pode ser a apresentação inicial da infecção; se positivo, os pacientes necessitarão de terapia antirretroviral além de plasmáfere-se. Em pacientes jovens, devem ser considerados testes genéticos para síndrome hemolítico-urêmica atípica familiar. A LDH costuma estar muito elevada.

Trombocitose

Trombocitose familiar

É uma condição rara, com herança autossômica dominante. Pode resultar de mutação no promotor de *THPO*, o gene que codifica a trombopoetina; o gene mutante origina um RNA mensageiro com estabilidade aberrante. Pode decorrer também de uma mutação ativadora dominante no gene *MPL* que codifica o receptor de trombopoetina [449]. *JAK2* V617I na linha germinativa também foi associada à trombocitose hereditária [450]. Uma herança aparentemente recessiva foi descrita em 1 família, mas a base genética não ficou esclarecida [451].

Hemograma

A contagem de plaquetas está aumentada. O VPM, e as demais séries do hemograma são normais. Foi descrita 1 família com trombocitose autossômica dominante com plaquetas de tamanho anormalmente pequeno [452]. Uma reação leucemóide prolongada foi descrita em 1 caso infantil [453].

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as trombocitoses reacionais e com a trombocitemia essencial. Deve-se suspeitar de trombocitose familiar quando houver trombocitose inexplicável em criança ou adulto jovem; exames dos familiares são indicados.

Exames adicionais

Se estiver disponível, deve ser indicada análise genética, tanto para confirmar o diagnóstico como para excluir o diagnóstico de trombocitemia essencial.

Trombocitemia essencial

Trombocitemia essencial (TE) é uma neoplasia mieloproliferativa (NMP) caracterizada pela produção aumentada de plaquetas. Na classificação da OMS, é definida como condição Ph-negativa, *BCR-ABL1* negativa. É predominantemente uma doença da população de meia-idade e idosa, mas também há casos em adultos jovens e até mesmo em crianças. Os aspectos clínicos são causados diretamente pela trombocitose, ou refletem a proliferação anormal de células mieloides: incluem obstrução microvascular, sangramento e, com menos frequência, esplenomegalia e prurido. A maioria dos casos, entretanto, é agora diagnosticada em estágio pré-sintomático, em consequência do uso generalizado de contadores automatizados que contam plaquetas sistematicamente e da crescente frequência com que são solicitados exames hematológicos.

A TE pode evoluir, em alguns casos, para mielofibrose e, raramente, para LMA. Esses estágios da doença podem ser precedidos por aspectos mielodisplásicos.

Hemograma

De acordo com classificação de 2008 da OMS, o diagnóstico é feito quando a contagem de plaquetas ultrapassa $450 \times 10^3/\mu\text{L}$ e é acompanhada por outros critérios ali definidos. Em muitos casos, a contagem de plaquetas ao diagnóstico está acima de $1 \times 10^6/\mu\text{L}$. A distensão sanguínea mostra anisocitose plaquetária e, em geral, grande número de plaquetas gigantes (Figura 8.96). Algumas plaquetas podem ser hipogranuladas. Neutrofilia está presente em cerca de um terço dos pacientes e correlaciona-se com maior risco de trombose [454]. A contagem de basófilos frequentemente está elevada, mas não costuma ultrapassar 3%. Uma contagem de basófilos de mais de 5% sugere que o paciente possa ser Ph-positivo. Algumas vezes, podem estar presentes raros eritroblastos e granulócitos imaturos. Pode haver sinais de deficiência de ferro em consequência de sangramento. Raramente, há sinais de hipoesplenismo, decorrente de infarto esplênico prévio. Na fase acelerada da doença, podem surgir aspectos mielodisplásicos (Figura 8.97).

A contagem de plaquetas, o VPM e a PDW estão elevados, ao passo que, em trombocitoses reacionais, o VPM e o PDW habitualmente não estão. Na trombocitose pós-esplenectomia e devida a hipoesplenismo, entretanto, pode haver aumento de VPM e PDW.

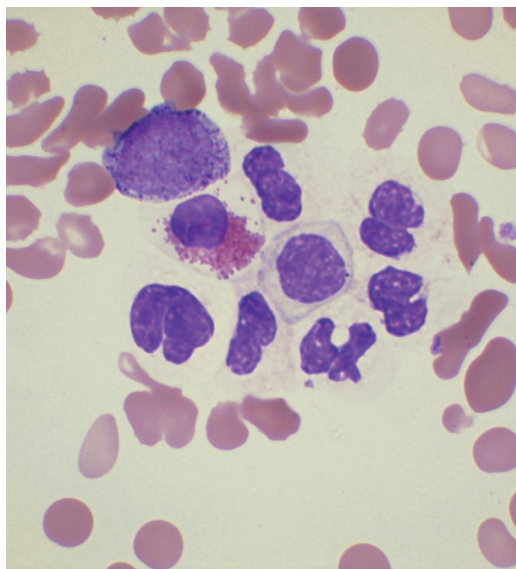


FIGURA 8.97 Distensão sanguínea de paciente com trombocitemia essencial em fase acelerada, mostrando aspectos mielodisplásicos nos granulócitos. Os neutrófilos são hipogranulares com núcleos de formato anormal. Há um eosinófilo não lobulado e número reduzido de grânulos. Nessa etapa, surge trombocitopenia.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita com várias dentre as outras causas de trombocitose (ver Tabela 6.15), particularmente as condições que causam trombocitose reacional sem sinais clínicos óbvios da doença subjacente, entre as quais estão neoplasias ocultas e doenças do tecido conectivo.

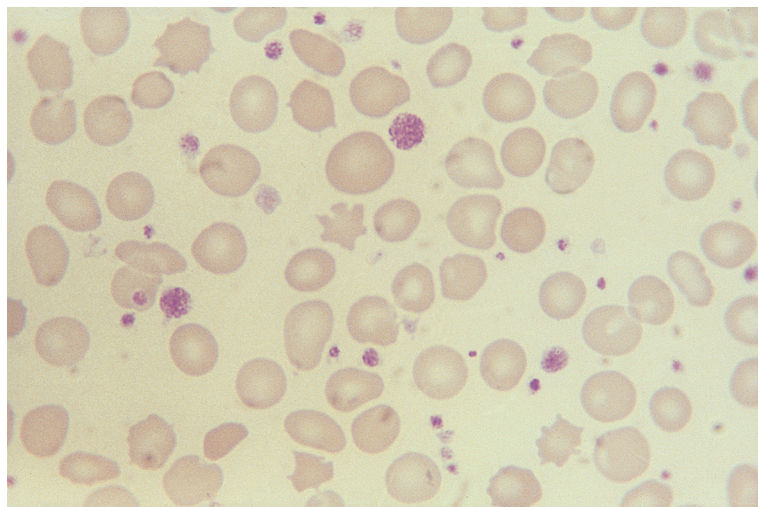


FIGURA 8.96 Distensão sanguínea de paciente com trombocitemia essencial mostrando trombocitose com anisocitose plaquetária e plaquetas gigantes. Há, também, anisocitose eritrocitária e pecilocitose.

A deficiência de ferro, mesmo não complicada, deve entrar no diagnóstico diferencial, porque pode, por si só, causar uma trombocitose igual ou superior a $450 \times 10^3/\mu\text{L}$. Em pacientes ferropênicos, a causa da trombocitose também pode ser uma neoplasia oculta, uma hemorragia oculta ou ambas. Poderá ser difícil, às vezes impossível, distinguir uma policitemia vera (PV) com deficiência de ferro, ou uma PV pré-policitemica, da TE. Cerca de 15% dos pacientes com PV à apresentação têm aspectos assemelhados aos da TE.

Exames adicionais

Uma suspeita de TE é indicação de análise molecular para *JAK2* V617F. Se a mutação não for encontrada, devem ser pesquisadas mutações *CALR* ou *MPL*. *JAK2* V617F é encontrada em cerca de dois terços dos pacientes e correlaciona-se com Hb [455-457] e contagem de leucócitos [454, 456] mais altas, eritropoese e granulocitopoese mais hiperplásticas na medula óssea [454, 456], eritropoetina e ferritina séricas mais baixas [456], microcitose mais frequente, maior possibilidade de evoluir para PV declarada [455, 456] e, em caso de gestante, pior prognóstico para o feto [458].

Mutação *CALR* é identificada em um quarto dos pacientes [459] e mutação *MPL*, em 5-10%. Usando análise de polimorfismo ligado ao sexo, pareceu anteriormente que número significativo de pacientes com TE tinham hematopoese policlonal; com a descoberta de *JAK2* V617F, pôde ser identificada clonalidade em significativa proporção desses pacientes (4 de 8 em um estudo) [460]. Análise citogenética é particularmente indicada quando não for claro que o paciente tem uma NMP e/ou se houver características atípicas da doença – como sinais mielodisplásicos, blastos circulantes ou basofilia acentuada –, o que sugere positividade para cromossomo Filadélfia (Ph1) ou outro cariótipo desfavorável com influência na escolha do tratamento. Atualmente, com disponibilidade de terapia efetiva de condições Ph-positivas com inibidores da tirosinaquinase, é necessário fazer análise citogenética ou molecular (para o gene de fusão *BCR-ABL1*) em todos os pacientes para identificar os Ph-positivos e tratá-los apropriadamente. Se forem identificados t(9;22)(q34;q11.2) ou gene de fusão *BCR-ABL1*, o diagnóstico é leucemia mieloide crônica (LMC), mesmo se não houver leucocitose. Na falta de tratamento com tirosinaquinase, casos da chamada TE Ph-positiva têm probabilidade aumentada de desenvolver SMD, mielofibrose

e transformação blástica. PV oculta ou pré-policitemica deve ser distinta de TE pelos testes supra descritos. Exame da medula óssea por aspiração e biópsia fornece evidências de NMP e ajuda a distinguir TE de PV e de mielofibrose pré-fibrótica. Megacariócitos estão presentes em número muito aumentado, são grandes, bem-lobulados e aglomerados, enquanto na PV os megacariócitos são mais pleomórficos; não há aumento de reticulina. Deve-se considerar, no entanto, que a deficiência de ferro, por si só, pode causar trombocitose, hiperplasia eritroide e aumento acentuado do número de megacariócitos na medula, de modo que, em pacientes com deficiência de ferro, o diagnóstico de TE deve ser feito com cautela. Uma eritropoetina sérica baixa é vista em, ao menos, um terço de pacientes com TE, de modo que não ajuda a diferenciá-la da PV [362]. A trombopoetina plasmática pode ser normal ou diminuída, nunca elevada. A detecção de esplenomegalia à ecografia sustenta o diagnóstico de trombocitemia, já que torna muito improvável o diagnóstico de trombocitose reacional [461]. Vários resultados laboratoriais, como aumento de fibrinogênio, proteína C-reativa ou VSG, podem fornecer evidência indireta de uma neoplasia oculta ou de uma doença do tecido conectivo como causa de trombocitose reacional em vez de TE. O escore LAP é baixo na maioria dos pacientes, aumentado em alguns e normal na maioria; é inútil para o diagnóstico diferencial e está em desuso.

Mielofibrose primária

Mielofibrose primária (MP), antes denominada mielofibrose idiopática crônica e mielofibrose com metaplasia mieloide, é uma neoplasia hematológica caracterizada por hematopoese extramedular associada a fibrose da medula óssea, esta reacional à proliferação mieloide subjacente. A descoberta da mutação *JAK2* V617F revelou que PV, TE e MP compreendem um conjunto de condições estreitamente relacionadas, distintas de outras NMPs. Mielofibrose subsequente a PV ou TE é em tudo similar à MP; policitemia às vezes desenvolve-se no decorso de MP.

Hemograma

O aspecto da distensão sanguínea é leucoeritroblástico e mostra anisocitose e pecilocitose, caracteristicamente com presença de dacríócitos (eritrócitos em formato de lágrima ou pera) (Figura 8.98); há, ainda, eliptócitos curtos (“*stubby*”) [462]. Nos primórdios da doença, pode haver leucocitose

e trombocitose; mais tarde na evolução, o hemograma torna-se progressivamente pancitopênico. Plaquetas gigantes e plaquetas agranuladas são comuns; ocasionalmente, há micromegacariócitos circulantes ou núcleos de megacariócitos (Figura 8.99). Análise multivariada mostra que o nível de anemia e o grau de leucocitose têm significação prognóstica independentes [463].

Tratamento com agentes citorredutores, como hidroxycarbamida, causa macrocitose, estomatocitose e redução das contagens de leucócitos e de plaquetas; tratamento com talidomida pode aumentar as contagens de leucócitos e plaquetas e a Hb [464].

Diagnóstico diferencial

Inclui outras causas de reação leucoeritroblástica e outras causas de pancitopenia (ver Tabelas 6.19 e 6.30). Em pacientes com trombocitose, o diagnóstico diferencial inclui TE e LMC.

Exames adicionais

É indicada análise molecular para *JAK2* V617F. Essa mutação está presente em cerca de 50% dos pacientes; é mais frequente em casos de mielofibrose que evoluíram a partir de PV do que em casos de MP [465]. A prevalência em mielofibrose pós-TE é intermediária. Em casos de MP, há correlação entre positividade para *JAK2* V617F e Hb mais alta. Caso não seja identificada a mutação *JAK2* V617F, devem ser pesquisadas as mutações *CALR* e *MPL*,

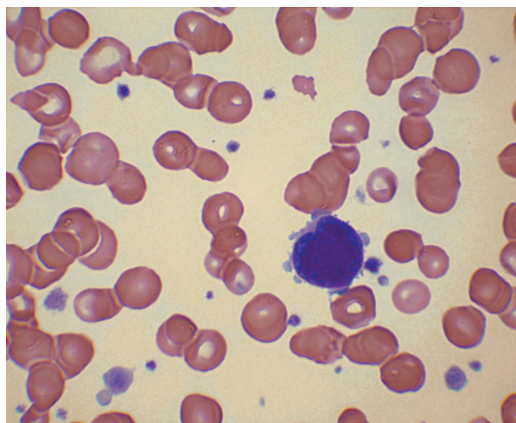


FIGURA 8.99 Distensão sanguínea de mielofibrose primária, mostrando um micromegacariócito circulante.

sendo evidenciadas em um terço e em 5-10% de casos respectivamente. Negatividade para as três mutações implica a indicação de análise molecular para *BCR-ABL1*, às vezes positiva, significando ter evoluído de LMC.

Biópsia da medula óssea é necessária ao diagnóstico seguro, e para distinguir o estágio inicial, pré-fibrótico ou hiperclular da MP da TE. Análise citogenética pode ser útil para fazer notar a presença do cromossomo Filadélfia. Às vezes, evidencia uma anormalidade citogenética clonal.

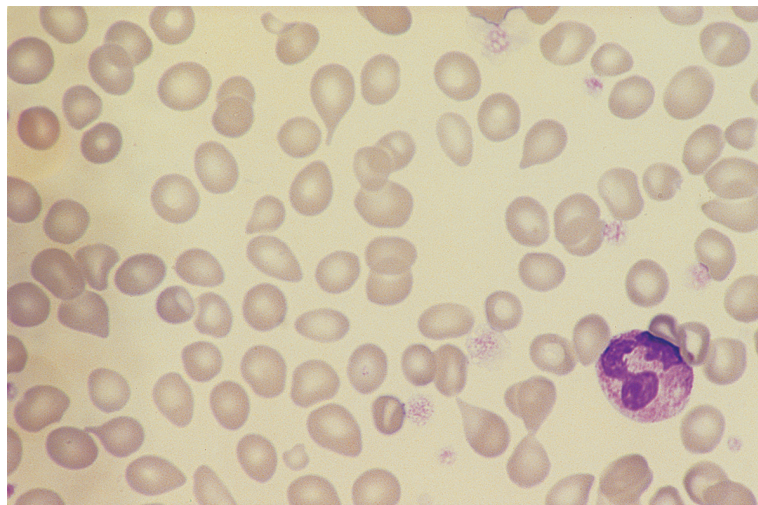


FIGURA 8.98 Distensão sanguínea em mielofibrose primária, mostrando anisocitose e pecilocitose com dacriocitose proeminente.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências

- Hershko C, Ronson A, Souroujon M, Maschler I, Heyd J and Patz J (2006) Variable hematologic presentation of autoimmune gastritis: age-related progression from iron deficiency to cobalamin depletion. *Blood*, **107**, 1673–1679.
- Pellegrino RM, Coutinho M, D'Ascola D, Lopes AM, Palmieri A, Carnuccio F *et al.* (2012) Two novel mutations in the *tmprss6* gene associated with iron-refractory iron-deficiency anaemia (irida) and partial expression in the heterozygous form. *Br J Haematol*, **158**, 670–671.
- Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T and Cavill I on behalf of British Committee for Standards in Haematology (2013) Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Z*, **161**, 639–648.
- Harrington AM, Ward PCJ and Kroft SH (2008) Iron deficiency anemia, β -thalassemia minor, and anemia of chronic disease. *Am J Clin Pathol*, **129**, 466–471.
- Jolobe OMP (2000) Prevalence of hypochromia (without microcytosis) vs microcytosis (without hypochromia) in iron deficiency. *Clin Lab Haematol*, **22**, 79–80.
- Patton WN, Cave RJ and Harris RI (1991) A study of changes in red cell volume and haemoglobin concentration during phlebotomy induced iron deficiency and iron repletion using the Technicon H1. *Clin Lab Haematol*, **13**, 153–161.
- Jolobe OMP (2011) Mean corpuscular haemoglobin, referenced and resurrected. *J Clin Pathol*, **64**, 833–834. 8 Bessman JD, Gilmer PR and Gardner FH (1983) Improved classification of the anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol*, **80**, 322–326.
- Schleper B and Stuerenburg HJ (2001) Copper deficiency-associated myelopathy in a 46-year-old woman. *J Neurol*, **248**, 705–706.
- Intragumtornchai T, Rojnukkarin P, Swasdikul D and Israsena S (1998) The role of serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with liver cirrhosis. *J Intern Med*, **243**, 233–241.
- Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, Mcilroy W and Patterson C (1992) Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med*, **7**, 145–153.
- Corte TJ and Tattersall S (2006) Iron deficiency anaemia: a presentation of idiopathic pulmonary haemosiderosis. *Int Med J*, **36**, 207–208.
- Rüfer A, Howell JP, Lange AP, Yamamoto R, Heuscher J, Gregor M and Wuillemin WA (2011) Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome (HHCS) presenting with iron deficiency anemia associated with a new mutation in the iron responsive element of the L ferritin gene in a Swiss family. *Eur J Haematol*, **87**, 274–278.
- 7 Punnonen K, Irjala K and Rajamaki A (1997) Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*, **89**, 1052–1057.
- Cermak J and Brabec V (1998) Transferrin receptor-ferritin index: a useful parameter in differential diagnosis of iron deficiency and hyperplastic erythropoiesis. *Eur J Haematol*, **61**, 210–212.
- Rimon E, Levy S, Sapir A, Gelzer G, Peled R, Ergas D and Stohoege ZM (2002) Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. *Arch Intern Med*, **162**, 445–449.
- Cook JD, Flowers CH and Skikne BS (2003) The quantitative assessment of body iron. *Blood*, **101**, 3359–3364.
- Witte DL, Kraemer DF, Johnson GF, Dick FR and Hamilton H (1986) Prediction of bone marrow iron findings from tests performed on peripheral blood. *Am J Clin Pathol*, **85**, 202–206.
- Loría A, Sanchez-Medal L, Lisker R, de Rodríguez E and Labardini J (1967) Red cell life span in iron deficiency anaemia. *Br J Haematol*, **13**, 294–302.
- Howard MR, Morley P, Turnbull AJ, Hollier P, Webb R, Wilkinson H and Clarke A (2000) A prospective study of screening for coeliac disease in laboratory defined iron and folate deficiency. *Hematol J*, **1**, Suppl. 1, 41.
- Weiss G and Goodnough LT (2005) Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*, **353**, 1011–1023.
- Marsh WL, Bishop JW and Darcy TP (1987) Evaluation of red cell volume distribution width (RDW). *Hematol Pathol*, **1**, 117–123.
- Cazzola M, May A, Bergamaschi G, Cerani P, Rosti V and Bishop DF (2000) Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females. *Blood*, **96**, 4363–4365.
- Pagon RA, Bird TD, Detter JC and Pierce I (1985) Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *J Med Genet*, **22**, 267–273.
- Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H and Shibahara S (2014) Identification of a novel erythroid-specific enhancer for the *ALAS2* gene and its loss-of-function mutation which is associated with congenital sideroblastic anemia. *Haematologica*, **99**, 252–261.
- Kannengiesser C, Sanchez M, Sweeney M, Hetet G, Kerr B, Moran E *et al.* (2011) Missense *SLC25A38* variations play an important role in autosomal recessive inherited sideroblastic anemia. *Haematologica*, **96**, 808–813.
- Camaschella C, Campanella A, De Falco L, Boschetti L, Merlini R, Silvestri L *et al.* (2007) The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, **110**, 1353–1358.

- 28 Cazzola M and Invernizzi R (2011) Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. *Haematologica*, **96**, 789–792.
- 29 Maguire A, Hellier K, Hammans S and May A (2001) X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the *ABC7* gene predicting V411L. *Br J Haematol*, **315**, 910–917.
- 30 Wiseman DH, May A, Jolles S, Connor P, Powell C, Heeney MM *et al.* (2013) A novel syndrome of congenital sideroblastic anemia, B-cell immunodeficiency, periodic fevers, and developmental delay (SIFD). *Blood*, **122**, 112–123.
- 31 Holme SA, Worwood M, Anstey AV, Elder GH and Badminton MN (2007) Erythropoiesis and iron metabolism in dominant erythropoietic protoporphyria. *Blood*, **110**, 4108–4110.
- 32 Grandchamp B, Hetet G, Kannengiesser C, Oudin C, Beaumont C, Rodrigues-Ferreira S *et al.* (2011) A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the *STEAP3/TSAP6* gene. *Blood*, **118**, 6660–6666.
- 33 Sieff CA, Nisbet-Brown E and Nathan DG (2000) Congenital bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol*, **111**, 30–37.
- 34 Borgna-Pignatti C, Marradi P, Pinelli L, Monetti N and Patrini C (1989) Thiamine-responsive anemia in DIDMOAD syndrome. *J Pediatr*, **114**, 405–410.
- 35 Tuckfield A, Ratnaike S, Hussein S and Metz J (1997) A novel form of hereditary sideroblastic anaemia with macrocytosis. *Br J Haematol*, **97**, 279–285.
- 36 Aguiar E, Freitas I and Barbot J (2014) Different haematological picture of congenital sideroblastic anaemia in a hemizygote and a heterozygote. *Br J Haematol*, **166**, 469.
- 37 Vives i Corrons LJ-L (2000) Chronic non-spherocytic haemolytic anaemia due to congenital pyrimidine 5' nucleotidase deficiency: 25 years later. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 103–118.
- 38 Mazza U, Saglio G, Cappio FC, Camaschella C, Neretto G and Gallo E (1976) Clinical and haematological data in 254 cases of beta-thalassaemia trait in Italy. *Br J Haematol*, **33**, 91–99.
- 39 d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, Mancini S and Mango G (1992) Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Arch Pathol Lab Med*, **116**, 84–89.
- 40 Weatherall DJ and Clegg JB (1981) *The Thalassaemia Syndromes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 41 Mentzer WC (1973) Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*, **i**, 882.
- 42 England JM and Fraser PM (1973) Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood count. *Lancet*, **i**, 449–452.
- 43 England JM, Bain BJ and Fraser PM (1973) Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*, **i**, 1514.
- 44 Srivastava PC (1973) Differentiation of thalassaemia minor from iron deficiency. *Lancet*, **ii**, 154–155.
- 45 Shine I and Lal S (1977) A strategy to detect β thalassaemia trait. *Lancet*, **I**, 692–694.
- 46 Green R and King R (1989) A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassaemia minor. *Blood Cells*, **15**, 481–495.
- 47 Jimenez CV, Minchinela J and Ros J (1995) New indices from H2 analyzer improve differentiation between heterozygous β and $\delta\beta$ thalassaemia. *Clin Lab Haematol*, **17**, 151–155.
- 48 Bain BJ (2006) *Haemoglobinopathy Diagnosis*, 2nd edn, Blackwell Publishing, Oxford.
- 49 Bain BJ (1988) Screening of antenatal patients in a multiethnic community for β -thalassaemia trait. *J Clin Pathol*, **41**, 481–485.
- 50 Polliack A and Rachmilewitz EA (1983) Ultrastructural studies in β -thalassaemia major. *Br J Haematol*, **24**, 319–326.
- 51 Dozy AM, Kan YW, Embury SH, Mentzer WC, Wang WC, Lubin B *et al.* (1979) α -globin gene organization in blacks precludes the severe form of α -thalassaemia. *Nature*, **280**, 605–607.
- 52 Serjeant GR, Serjeant BE, Forbes M, Hages RJ, Higgs DR and Lehmann H (1986) Haemoglobin gene frequencies in the Jamaican population: a study of 100,000 newborns. *Br J Haematol*, **64**, 253–262.
- 53 Falusi AG, Esan GJF, Ayyub H and Higgs DR (1987) Alpha-thalassaemia in Nigeria: its interaction with sickle-cell disease. *Eur J Haematol*, **38**, 370–375.
- 54 Tzotzos S, Kavavakis E, Metaxotou-Mavromati A and Kattamis C (1986) The molecular basis of haemoglobin H disease in Greece. *Br J Haematol*, **63**, 263–271.
- 55 Serjeant GR (1974) *The Clinical Features of Sickle Cell Disease*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 56 Wong W-Y, Zhou Y, Operskalski EA, Hassett J, Powars DR, Mosley JW and the Transfusion Safety Study Group (1996) Hematologic profile and lymphocyte subpopulations in hemoglobin SC disease: comparison with hemoglobin SS and black controls. *Am J Hematol*, **52**, 150–154.
- 57 Davis LR (1976) Changing blood picture in sickle cell anaemia from shortly after birth to adolescence. *J Clin Pathol*, **29**, 898–901.
- 58 Serjeant GR, Grandison Y, Lowrie Y, Mason K, Phillips J, Serjeant BE and Vaidya S (1981) The development of haematological changes in homozygous sickle cell disease: a cohort study from birth to 6 years. *Br J Haematol*, **48**, 533–543.
- 59 Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D *et al.* (2000) Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med*, **342**, 1855–1865.
- 60 Islam MS and Chia L (2010) Hyperhemolysis syndrome in a patient with sickle cell disease with erythrophagocytosis in peripheral blood. *Eur J Haematol*, **84**, 188.
- 61 Lesesve J-F and Perrin J (2012) Association of homozygous sickle cell anemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Eur J Haematol*, **88**, 370.
- 62 Glader BE, Propper RD and Buchanan GR (1979) Microcytosis associated with sickle cell anemia. *Am J Clin Pathol*, **72** 63–64.

- 63 Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J and Groner W (1986) Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood*, **68**, 506–513.
- 64 Ballard SK and Smith ED (1992) Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood*, **79**, 2154–2163.
- 65 Monplaisir N, Merault G, Poyart C, Rhoda MD, Craescu CT, Vidaud M *et al.* (1987) Hb-S-Antilles ($\alpha\beta_2$ Glu Val, 23Val1 Ile): a new variant with lower solubility than Hb S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Acta Haematol*, **78**, 222.
- 66 Wilson CI, Hopkins PL, Cabello-Inchausti B, Melnick SJ and Robinson MJ (2000) The peripheral blood smear in patients with sickle cell trait: a morphologic observation. *Lab Med*, **31**, 445–447.
- 67 Mowafy N (2005) *Hematomorphology*. XXXth Congress of the International Society of Hematology, Istanbul.
- 68 Sheehan RG and Frenkel EP (1983) Influence of hemoglobina phenotype on the mean erythrocyte volume. *Acta Haematol*, **69**, 260–265.
- 69 Mears JG, Lachman HM, Labie D and Nagel RL (1983) Alpha-thalassaemia trait is related to prolonged survival in sickle cell anemia. *Blood*, **62**, 286–290.
- 70 Beutler E and West C (2005) Hematologic differences between African-Americans and whites; the role of iron deficiency and α -thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. *Blood*, **106**, 740–745.
- 71 Serjeant GR and Serjeant BE (1972) A comparison of erythrocyte characteristics in sickle cell syndromes in Jamaica. *Br J Haematol*, **23**, 205–213.
- 72 Serjeant GR, Sommereux A, Stevenson M, Mason K and Serjeant BE (1979) Comparison of sickle cell- β^0 -thalassaemia with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*, **41**, 83–93.
- 73 Bain BJ (1992) Blood film features of sickle cell-haemoglobin C disease. *Br J Haematol*, **83**, 516–518.
- 74 Diggs LW and Bell A (1965) Intraerythrocytic hemoglobin crystals in sickle cell-hemoglobin C disease. *Blood*, **25**, 218–223.
- 75 Lawrence C, Hirsch RE, Fataliev NA, Patel S, Fabry ME and Nagel RL (1997) Molecular interactions between Hb α -G Philadelphia, HbC and HbS: phenotypic implications for SC α -G Philadelphia disease. *Blood*, **90**, 2819–2825.
- 76 Ballas SK, Larner J, Smith ED, Surrey S, Schwartz E and Rappaport EF (1987) The xerocytosis of SC disease. *Blood*, **69**, 124–130.
- 77 Lachant NA (1987) Hemoglobin E: an emerging hemoglobinopathy in the United States. *Am J Hematol*, **25**, 449–462.
- 78 Bunyaratvej A, Sahaphong S, Bhamarapravati N and Wasi P (1985) Quantitative changes in red blood cell shapes in relation to clinical features in β -thalassemia/HbE disease. *Am J Clin Pathol*, **83**, 555–559.
- 79 Rieder RF and Bradley TB (1968) Hemoglobin Gun Hill: an unstable protein associated with chronic hemolysis. *Blood*, **32**, 355–369.
- 80 Whitehead VM, Rosenblatt DS and Cooper DA (2003) Megaloblastic anemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT (eds), *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 81 van der Zee SP, Schretlen ED and Monnens LA (1968) Megaloblastic anaemia in the Lesch-Nyhan syndrome. *Lancet*, **i**, 1427.
- 82 Andr  s E, Affenberger S, Zimmer J, Vinzio S, Grosu D, Pistol G *et al.* (2006) Current hematological findings in cobalamin deficiency. A study of 201 consecutive patients with documented cobalamin deficiency. *Clin Lab Haematol*, **28**, 50–56.
- 83 Bhatnagar N, Wechalekar A and McNamara C (2012) Pancytopenia due to severe folate deficiency. *Int Med J*, **42**, 1063–1064.
- 84 Taylor C and Bain BJ (1991) Technicon H.1 automated white cell parameters in the diagnosis of megaloblastic erythropoiesis. *Eur J Haematol*, **46**, 248–249.
- 85 Bessman JD, Williams LJ and Gilmer PR (1982) Platelet size in health and hematologic disease. *Am J Clin Pathol*, **78**, 150–153.
- 86 Bain BJ and Taylor C (1991) *L'uso dei parametri leucocitari automatizzati nella diagnosi dell'anemia megaloblastica*. Atti del V Incontro del Club Utilizzatori Sistemi Ematologici Bayer-Technicon, Montecatini Terme, Giugno.
- 87 Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP and Allen RH (1990) Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol*, **34**, 99–107.
- 88 Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP and Allen RH (1994) Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosis of cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med*, **96**, 239–246.
- 89 Muckerheide MM, Wolfman JA, Rohde DA and McManamy GE (1984) Studies on a radioassay for intrinsic factor antibody: comparison of methods and false positive results due to elevated serum B12 levels. *Am J Clin Pathol*, **82**, 300–304.
- 90 Carmel R (2008) How I treat cobalamin (vitamin B₁₂) deficiency. *Blood*, **112**, 2214–2221.
- 91 Rov   A, St  ssi G, Meyer-Monard S, Favre G, Tsakiris D, Heim D *et al.* (2010) Sideroblastic changes of the bone marrow can be predicted by the erythrogram of peripheral blood. *Int J Lab Hematol*, **32**, 339–325.
- 92 Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wimazal F, Sperr WR, Mufti G and Horny HP (2011) Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*, **36**, 1–5.
- 93 Delaunay J (2002) Molecular basis of red cell membrane disorders. *Acta Haematol*, **108**, 210–218.
- 94 Tse WT and Lux SE (1999) Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol*, **104**, 2–13.

- 95 Miraglia del Giudice E, Nobili B, Francese M, d'Urso L, Iolascon A, Eber S and Perrotta S (2001) Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, **112**, 42–47.
- 96 Bruce LJ and Tanner MJA (2000) Erythroid band 3 variants and disease. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 637–654.
- 97 McMullin M (1999) The molecular basis of disorders of the red cell membrane. *J Clin Pathol*, **52**, 245–248.
- 98 Yawata Y (2001) Genotyping and phenotyping characteristics in hereditary red cell membrane disorders. *Gene Funct Dis*, **2**, 113–121.
- 99 Bruce LJ, Ghosh S, King MJ, Layton M, Mawby WJ, Stewart GJ *et al.* (2002) Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood*, **100**, 1878–1885.
- 100 Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomes C, Texier P, Lemos C *et al.* (2000) Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood*, **96**, 1602–1604.
- 101 <http://www.hgmd.org/> (accessed April 2014).
- 102 www.omim.org/ (accessed April 2014).
- 103 Godal HC and Refsum HE (1979) Haemolysis in athletes due to hereditary spherocytosis. *Scand J Haematol*, **22**, 83–86.
- 104 Delhommeau F, Cynober T, Schischmanoff PO, Rohrlisch P, Delaunay J, Mohandas N and Tchernia G (2000) Natural history of hereditary spherocytosis during the first year of life. *Blood*, **95**, 393–397.
- 105 Sugihara T, Miyashima K and Yawata Y (1984) Disappearance of microspherocytes in peripheral circulation and normalization of decreased lipids in plasma and in red cells of patients with hereditary spherocytosis after splenectomy. *Am J Hematol*, **17**, 129–139.
- 106 Gallagher PG and Lux SE (2003) Disorders of the erythrocyte membrane. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT (eds), *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 107 Palek J and Jarolim P (1993) Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol*, **30**, 249–283.
- 108 Palek J and Sahr K (1992) Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood*, **80**, 308–330.
- 109 Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Yi SJ, Hanspal M, Johnson CA and Palek J (1997) Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency due to an unstable truncated β spectrin. *Blood*, **87**, 2538–2545.
- 110 Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Njolstad PR, Rogas JJ, Ballas SH *et al.* (1997) Characterisation of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. *Blood*, **90**, 398–406.
- 111 Bassères DS, Vincentim DL, Costa FF and Saad STO (1998) β -spectrin Promissão: a translation initiation codon mutation of the β -spectrin gene (ATG→GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family. *Blood*, **91**, 368–369.
- 112 Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomez C, Texier P, Lemos C *et al.* (2000) Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with total absence of band 3. *Blood*, **96**, 1602–1604.
- 113 Pati AR, Patten WN and Harris RI (1989) The use of the Technicon H1 in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Lab Haematol*, **11**, 27–30.
- 114 Chiron M, Cynober T, Mielot F, Tchernia G and Croisolle L (1999) The GEN-S: a fortuitous finding of a routine screening test for hereditary spherocytosis. *Hemato Cell Ther*, **Spring**, 113–116.
- 115 Broséus J, Visomblain B, Guy J, Maynadié M and Girodon F (2010) Evaluation of mean spherocorpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol*, **32**, 519–523.
- 116 Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P and King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (2004) Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, **126**, 455–474.
- 117 King M-J, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D and Chambers K (2000) Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **111**, 924–933.
- 118 Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortezzi A *et al.* (2012) Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study on 150 patients grouped according to the molecular and clinical characteristics. *Haematologica*, **97**, 516–523.
- 119 Girodon F, Garçon L, Bergoin E, Largier M, Delaunay J, Fénéant-Thibault M *et al.* (2008) Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *Br J Haematol*, **140**, 468–470.
- 120 Fawaz NA, Beshlawi IO, Al Zadjali S, Al Ghaithi HK, Elnaggari MA, Elnour I *et al.* (2012) dRTA and hemolytic anemia: first detailed description of *SLC4A1* A858D mutation in homozygous state. *Eur J Haematol*, **88**, 350–355.
- 121 King M-J (2000) Diagnosis of red cell membrane disorders. *CME Bull Haematol*, **3**, 39–41.
- 122 Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P and King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (2010) Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis–2011 update. *Br J Haematol*, **126**, 455–474.
- 123 Lecomte MC, Garbarz M, Gautero H, Bournier A, Galand C, Boivin P and Dhermy D (1993) Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis (HE) with spectrin I variants. *Br J Haematol*, **85**, 584–595.

- 124 Iolascon A, Perrotta S and Stewart GW (2003) Red blood cell membrane defects. *Rev Clin Exp Hematol*, **7**, 22–56.
- 125 Reid ME (1993) Associations of red blood cell membrane abnormalities with blood group phenotype. In: Garratty G (ed.) *Immunobiology of Transfusion Medicine*, Marcel Dekker, New York.
- 126 Patel SS, Mehlotra RK, Kastens W, Mgone CS, Kazura JW and Zimmerman PA (2001) The association of the glyophorin C exon 3 deletion with ovalocytosis and malaria susceptibility in the Wosera, Papua New Guinea. *Blood*, **98**, 3489–3491.
- 127 King M-J and Zanella A (2013) Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol*, **35**, 237–243.
- 128 Lecomte MC, Gautero H, Boumier O, Galand C, Lahary A, Vannier JP *et al.* (1992) Elliptocytosis-associated spectrin Rouen ($\beta^{220/218}$) has a truncated but still phosphorylatable β chain. *Br J Haematol*, **80**, 242–250.
- 129 Jarolim P, Wichterle H, Hasnpal M, Murray J, Rubin HL and Palek J (1995) β spectrin^{PRAGUE}: a truncated β spectrin producing β spectrin deficiency, defective spectrin heterodimers association and a phenotype of spherocytic elliptocytosis. *Br J Haematol*, **91**, 502–510.
- 130 Bassères DS, Pranke PHL, Vincentim DL, Costa FF and Saad STO (1998b) Expression of spectrin α 1/50 hereditary elliptocytosis and its association with the α^{EIV} allele. *Acta Haematol*, **100**, 32–38.
- 131 Bain BJ, Swirsky D, Bhavnani M, Layton M, Parker N, Makris M *et al.* (2001) British Society for Haematology Slide Session, Annual Scientific Meeting of BSH, Bournemouth, 2000. *Clin Lab Haematol*, **23**, 1–5.
- 132 Silveira P, Cynober T, Dhermy D, Mohandas N and Tchernia G (1997) Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. *Am J Clin Pathol*, **108**, 391–399.
- 133 Conboy JG, Mohandas N, Tchernia G and Kan YW (1986) Molecular basis of hereditary elliptocytosis due to protein 4.1 deficiency. *N Engl J Med*, **315**, 680–685.
- 134 Alloisio N, Morlé L, Pothier B, Roux A-F, Maréchal J, Ducluzeau M-T *et al.* (1988) Spectrin Oran (α^{IV21}), a new spectrin variant concerning the α II domain and causing severe elliptocytosis in the homozygous state. *Blood*, **71**, 1039–1047.
- 135 Pajor A and Lehozky D (1996) Hemolytic anemia precipitated by pregnancy in a patient with hereditary elliptocytosis. *Am J Hematol*, **52**, 240–241.
- 136 Castleton A, Burns A, King M-J and McNamara C (2007) Acute anaemia in a renal transplant patient. *Int Med J*, **37**, 419–420.
- 137 Austin RF and Desforjes JF (1969) Hereditary elliptocytosis: an unusual presentation of hemolysis in the newborn associated with transient morphologic abnormalities. *Pediatrics*, **44**, 189–200.
- 138 Coetzer T, Lawler J, Prchal JT and Palek J (1987) Molecular determinants of clinical expression of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood*, **70**, 766–772.
- 139 Djaldetti M, Cohen A and Hart J (1982) Elliptocytosis preceding myelofibrosis in a patient with polycythemia vera. *Acta Haematol*, **72**, 26–28.
- 140 Rummens IL, Verfaillie C, Criel A, Hidajat M, Vanhoof A, van den Berghe H and Louwagie A (1986) Elliptocytosis and schistocytosis in myelodysplasia: report of two cases. *Acta Haematol*, **75**, 174–177.
- 141 Kedar PS, Colah RB, Kulkarni S, Ghosh K and Mohanty D (2003) Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. *Clin Lab Haematol*, **26**, 373–376.
- 142 Palek J and Lambert S (1990) Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol*, **27**, 290–332.
- 143 Bain BJ and Liesner R (1996) Pseudopyropoikilocytosis: a striking artefact. *J Clin Pathol*, **49**, 772–773.
- 144 King MJ, Telfer P, MacKinnon H, Langabeer L, McMahon C, Darbyshire P and Dhermy D (2008) Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*, **74**, 244–250.
- 145 Coetzer TL, Beeton L, van Zyl D, Field SP, Agherdien A, Smart E and Daniels GL (1996) Southeast Asian ovalocytosis in a South African kindred with hemolytic anemia. *Blood*, **87**, 1656–1657.
- 146 Liu S-C, Zhai S, Palek J, Golan DE, Amato D, Hassan K *et al.* (1990) Molecular defect of the band 3 protein in Southeast Asian ovalocytosis. *N Engl J Med*, **323**, 1530–1538.
- 147 Guizouam H, Borgese F, Gabillat N, Harrison P, Gode JS, McMahon C *et al.* (2011) South-east Asian ovalocytosis and the cryohydrocytosis form of hereditary stomatocytosis show virtually indistinguishable cation permeability defects. *Br J Haematol*, **152**, 655–664.
- 148 Laosombat V, Viprakasit V, Dissaneevate S, Leetanaporn R, Chotsampancharoen T, Wongchanchailert M *et al.* (2010) Natural history of Southeast Asian Ovalocytosis during the first 3 years of life. *Blood Cells Mol Dis*, **45**, 29–32.
- 149 O'Donnel A, Allen SJ, Mgone CS, Martinson JJ, Clegg JB and Weatherall DJ (1998) Red cell morphology and malaria anaemia in children with Southeast Asian ovalocytosis and band 3 in Papua and New Guinea. *Br J Haematol*, **101**, 407–412.
- 150 Booth PB, Serjeantson S, Woodfield DG and Amato D (1977) Selective depression of blood group antigens associated with hereditary ovalocytosis among Melanesians. *Vox Sang*, **32**, 99–110.
- 151 Stewart GW, Hepworth-Jones BE, Keen JN, Dash BCJ, Argent AC and Casimir CM (1992) Isolation of cDNA coding for a ubiquitous membrane protein deficient in high Na⁺, low K⁺ stomatocytic erythrocytes. *Blood*, **79**, 1593–1661.
- 152 Yawata Y, Kanzaki A, Sugihara T, Inoue T, Yawata A, Kaku M *et al.* (1996) Band 4.2 doublet Nagano: a trait with 72 kD and 74 kD peptides of red cell band 4.2 in equal amount and with increased red cell

- membrane cholesterol and phosphatidyl choline. *Br J Haematol*, **93**, Suppl. 2, 199.
- 153 Yawata Y, Kanzaki A, Inoue T, Yawata A, Kaku M, Takezono M *et al.* (1996b) Partial deficiency of band 4.2 due to its impaired binding to a mutated band 3 in a homozygote of band 3 Fukuoka (133 GGA→AGA:Gly→Arg). *Br J Haematol*, **93**, Suppl. 2, 199.
 - 154 Mohandas N and Gascard P (2000) What do mouse gene knockouts tell us about the structure and function of the red cell membrane? *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 605–620.
 - 155 Stewart GW and Turner EJH (2000) The hereditary stomatocytoses and allied disorders of erythrocyte membrane permeability to Na and K. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 707–727.
 - 156 Bruce LJ, Guizouarn H, Burton NM, Gabillat N, Poole J, Flatt JF *et al.* (2009) The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein, *Blood*, **113**, 1350–1357.
 - 157 Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, Maksimova Y, Houston DS, Smith B *et al.* (2012) Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*, **120**, 1908–1915.
 - 158 Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Ruisso T, De Falco L *et al.* (2013) Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood*, **121**, 3295–3935.
 - 159 Bruce LJ, Robinson HC, Guizouarn H, Borgese F, Harrison P, King M-J *et al.* (2005) Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat Genet*, **37**, 1258–1263.
 - 160 Flatt JF, Guizouarn H, Burton NM, Borgese F, Tomlinson RJ, Forsyth RJ *et al.* (2011) Stomatatin-deficient cryohydrocytosis results from mutations in *SLC2A1*: a novel form of GLUT1 deficiency syndrome. *Blood*, **118**, 5267–5277.
 - 161 Barton CJ, Chowdhury V and Marin D (2003) Hereditary haemolytic anaemias and parvovirus infections in Jehovah's witnesses. *Br J Haematol*, **121**, 675–676.
 - 162 Jackson JM, Stanley ML, Crawford IG, Barr AL and Hilton HB (1978) The problem of Mediterranean stomatocytosis. *Aust NZ J Med*, **8**, 216–217.
 - 163 Grootenboer S, Schischmanhoff PO, Cynober T, Rodrigue J-C, Delaunay J, Tchernia G and Dommergues J-P (1998) A genetic syndrome associating dehydrated hereditary stomatocytosis, pseudohyperkalaemia and perinatal oedema. *Br J Haematol*, **103**, 383–386.
 - 164 Clark MR, Shohet SB and Gottfried EL (1993) Hereditary hemolytic disease with increased red blood cell phosphatidylcholine and dehydration: one, two, or many disorders? *Am J Hematol*, **42**, 25–30.
 - 165 Vives Corrons JL, Besson I, Merino A, Monteagudo J, Reverter JC, Aguilar JL and Enrich C (1991) Occurrence of hereditary leaky red cell syndrome and partial coagulation factor VII deficiency in a Spanish family. *Acta Haematol*, **86**, 194–199.
 - 166 Stewart GW, Corral RJM, Fyffe JA, Stockdill GM and Strong JA (1979) Familial pseudohyperkalaemia: a new syndrome. *Lancet*, **ii**, 175–177.
 - 167 Haines PG, Crawley C, Chetty MC, Jarvis H, Coles SE, Fisher J *et al.* (2001) Familial pseudohyperkalaemia Chiswick: a novel congenital thermotropic variant of K and Na transport across the human red cell membrane. *Br J Haematol*, **112**, 469–474.
 - 168 Coles SE, Chetty MC, Ho MM, Nicolaou A, Kearney JW, Wright SD and Stewart GW (1999) Two British families with variants of the 'cryohydrocytosis' form of hereditary stomatocytosis. *Br J Haematol*, **105**, 1055–1065.
 - 169 Haines PG, Jarvis HG, King S, Noormohamed FH, Chetty MC, Coles SE *et al.* (2001) Two further British families with the 'cryohydrocytosis' form of hereditary stomatocytosis. *Br J Haematol*, **113**, 932–937.
 - 170 Fricke B, Jarvis HG, Reid CD, Aguilar-Martinez P, Robert A, Quitted P *et al.* (2004) Four new cases of stomatocytosis hereditary stomatocytosis syndrome: association of the stomatin-deficient cryohydrocytosis variant with neurological dysfunction. *Br J Haematol*, **125**, 796–803.
 - 171 Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, Maljevic S *et al.* (2008) GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest*, **118**, 2157–2168.
 - 172 Rees DC, Iolascon A, Carella M, O'Marcaigh AS, Kendra JR, Jowitt SN *et al.* (2005) Stomatocytic haemolysis and macrothrombocytopenia (Mediterranean stomatocytosis/macrophthalmocytopenia) is the haematological presentation of phytosterolaemia. *Br J Haematol*, **130**, 297–309.
 - 173 Stewart GW, Lloyd J and Pegel K (2006) Mediterranean stomatocytosis/macrophthalmocytopenia: update from Adelaide, Australia. *Br J Haematol*, **132**, 651–661.
 - 174 Redman CM, Russo D and Lee S (2000) Kell, Kx and the McLeod phenotype. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 621–635.
 - 175 Hardie RJ (1989) Acanthocytosis and neurological impairment – a review. *Q J Med*, **71**, 291–306.
 - 176 Kay MM, Bosman GJ and Lawrence C (1988) Functional topography of band 3: specific structural alteration linked to functional aberrations in human erythrocytes. *Proc Nat Acad Sci*, **85**, 492–496.
 - 177 Bruce LJ, Kay MM, Lawrence C and Tanner MJ (1993) Band 3 HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport, carries the mutation pro868-to-leu in the membrane domain of band 3. *Biochem J*, **293**, 317–320.
 - 178 Yamashima M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H *et al.* (1990) Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, **328**, 1184–1189.

- 179 Cartron J-P (2000) RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 655–689.
- 180 Wood L, Jacobs P, Byrne M, Marais D and Jackson G (1997) Iron deficiency as a consequence of serial plasma exchange for the management of familial hypercholesterolaemia. *Proceedings of the 37th Annual Congress of the South African Societies of Pathology*, 160.
- 181 Bernini L, Latte B, Siniscalco M, Piomelli S, Spada U, Adinolfi M and Mollison PL (1964) Survival of ^{51}Cr -labelled red cells in subjects with thalassaemia-trait or G6PD deficiency or both abnormalities. *Br J Haematol*, **10**, 171–180.
- 182 Piomelli S and Siniscalco M (1969) The haematological effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassaemia trait: interaction between the two genes at the phenotype level. *Br J Haematol*, **16**, 537–549.
- 183 Mehta A, Mason PJ and Vulliamy TJ (2000) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 21–38.
- 184 Lim F, Vulliamy T and Abdalla SH (2005) An Ashkenazi Jewish woman presenting with favism. *J Clin Pathol*, **58**, 317–319.
- 185 Zanella A, Fermo E, Bianchi P and Valentini G (2005) Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol*, **130**, 11–25.
- 186 Mentzer WC (2003) Pyruvate kinase deficiency and disorders of glycolysis. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT (eds), *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 187 Mainwaring CJ, James CM, Butcher J and Clarke S (2001) Haemolysis and the combined oral contraceptive pill. *Br J Haematol*, **115**, 710–714.
- 188 Branca R, Costa E, Rocha S, Coelho H, Quintanilha A, Cabeda JM *et al.* (2004) Coexistence of congenital red cell pyruvate kinase and band 3 deficiency. *Clin Lab Haematol*, **26**, 297–300.
- 189 Leblond PF, Lonnais J and Delage J-M (1978) Erythrocyte populations in pyruvate kinase deficiency anaemias following splenectomy. *Br J Haematol*, **39**, 55–61.
- 190 Brecher G and Bessis M (1972) Present status of spiculated red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: a critical review. *Blood*, **40**, 333–344.
- 191 van Wijk R and van Solinge WW (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte abnormalities of glycolysis. *Blood*, **106**, 4034–4042.
- 192 Fujii H and Miwa S (1990) Recent progress in the molecular genetic analysis of erythroenzymopathy. *Am J Hematol*, **34**, 301–310.
- 193 Tanaka KR and Zerez CR (1990) Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. *Semin Hematol*, **27**, 165–185.
- 194 McMullin M (1999) The molecular basis of disorders of red cell enzymes. *J Clin Pathol*, **52**, 241–244.
- 195 Jacobasch G (2000) Biochemical and genetic basis of red cell enzyme deficiencies. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 1–20.
- 196 Kanno H (2000) Hekokinase: gene structure and mutations. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 83–88.
- 197 Kanno H, Murakami K, Hariyama Y, Ishikawa K, Miwa S and Fujii H (2002) Homozygous intragenic deletion of type I hexokinase gene causes lethal hemolytic anemia of the affected fetus. *Blood*, **100**, 1930.
- 198 Kugler W and Lakomek M (2000) Glucose-6-phosphate isomerase deficiency. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 89–102.
- 199 Fujii H and Miwa S (2000) Other erythrocyte enzyme deficiencies associated with non-haematological symptoms: phosphoglycerate kinase and phosphofructokinase deficiency. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 141–148.
- 200 Kreuder J, Borkhardt A, Repp R, Pekrun A, Gottsche B, Gottschalk U *et al.* (1996) Brief report: inherited metabolic myelopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *N Engl J Med*, **334**, 1100–1104.
- 201 Yao DC, Tolan DR, Murray ME, Harris DJ, Darras BT, Geva A and Neufeld EJ (2004) Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA(Arg303X/Cys338Tyr). *Blood*, **103**, 2401–2403.
- 202 Schneider A (2000) Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 119–140.
- 203 Valentin C, Pissard S, Martin J, Héron D, Labrune P, Livet M-O *et al.* (2000) Triose phosphate isomerase deficiency in 3 French families: two novel null alleles, a frameshift mutation (TPI Alfortville) and an alteration in the initiation codon (TPI Paris) *Blood*, **96**, 1130–1135.
- 204 Zanella A and Bianchi P (2000) Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 57–82.
- 205 Bianchi P, Zappa M, Bredi E, Vercellati C, Pelissero G, Barraco F and Zanella A (1999) A case of complete adenylate kinase deficiency due to a nonsense mutation in AK-1 gene (Arg 107→Stop, CGA→TGA) associated with chronic haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **105**, 75–79.
- 206 Toren A, Brok-Simoni F, Ben-Bassat I, Holtzman F, Mandel M, Neumann Y *et al.* (1994) Congenital haemolytic anaemia associated with adenylate kinase deficiency. *Br J Haematol*, **87**, 376–380.
- 207 Bianchi P, Fermo E, Alfinito F, Vercellati C, Baserga M, Ferraro F *et al.* (2003) Molecular characterization of six unrelated Italian patients affected by pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Br J Haematol*, **122**, 847–851.
- 208 Rees DC, Duley DA and Marinaki AM (2003) Pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. *Br J Haematol*, **120**, 375–383.

- 209 Zanella A, Bianchi P, Fermo E and Valentini G (2006) Hereditary pyrimidine 5' nucleotidase deficiency; from genetics to clinical manifestations. *Br J Haematol*, **133**, 113–123.
- 210 Chottiner EG, Ginsburg D, Tartaglia AP and Mitchell BS (1989) Erythrocyte adenosine deaminase overproduction in hereditary haemolytic anemia. *Blood*, **74**, 448–453.
- 211 Fiorelli G, Martinez di Montmuros F and Cappellini MD (2000) Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 39–55.
- 212 Ristoff E, Augustson C, Geissler J, de Rijk T, Carlsson K, Luo J-L *et al.* (2000) A missense mutation in the heavy subunit of γ -glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. *Blood*, **95**, 2193–2197.
- 213 Mañú Pereira M, Gelbart T, Ristoff E, Crain KC, Bergua JM, López Lafuente A *et al.* (2007) Chronic non-spherocytic hemolytic anemia associated with severe neurological disease due to γ -glutamylcysteine synthetase deficiency in a patient of Moroccan origin. *Haematologica*, **92**, e102–e105.
- 214 Vives Corrons J-L, Alvarez R, Pujades A, Zarza R, Oliva E, Lasheras G *et al.* (2001) Hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia due to red blood cell glutathione synthetase deficiency in four unrelated patients from Spain: clinical and molecular studies. *Br J Haematol*, **112**, 475–482.
- 215 Boxer LA, Oliver JM, Spielberg SP, Allen JM and Schulman JD (1979) Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency. *N Engl J Med*, **310**, 901–905.
- 216 Necheles TF, Steinberg MH and Cameron D (1970) Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency. *Br J Haematol*, **19**, 605–612.
- 217 Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N *et al.* (2007) Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*, **109**, 3560–3566.
- 218 Schneider A, Westwood B, Yim C, Prchal J, Berkow R, Labotka R *et al.* (1995) Triosephosphate isomerase deficiency: repetitive occurrence of a point mutation in amino acid 104 in multiple apparently unrelated families. *Am J Hematol*, **50**, 263–268.
- 219 Miwa S, Fujii H, Tani K, Takahashi K, Takegawa S, Fujinami N *et al.* (1981) Two cases of red cell aldolase deficiency associated with hereditary hemolytic anemia in a Japanese family. *Am J Hematol*, **11**, 425–437.
- 220 Feo CJ, Tchernia G, Subtil E and Leblond PF (1978) Observations of echinocytosis in eight patients: a phase contrast and SEM study. *Br J Haematol*, **40**, 519–526.
- 221 Valentine WN, Schneider AS and Baughan MA (1966) Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. Studies in kindreds with coexisting sickle cell trait and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Med*, **41**, 27–41.
- 222 Vives Corrons JL, Camera A, Triginer J, Kahn A and Rozman C (1974) Anemia hemolitica por déficit congénito en fosfohexosaisomerasa—descripción de una nueva variante (PHI Barcelon) con estomatocitosis y disminución de la resistencia osmotica eritrocitaria. *Sangre*, **20**, 197–206.
- 223 Qualtieri A, Pedoce V, Bisconte MG, Bria M, Gulino B, Andreoli V and Brancati C (1997) Severe erythrocyte adenylate kinase deficiency due to homozygous A→G substitution at codon 164 of human AK1 gene associated with chronic haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **99**, 770–776.
- 224 Fermo E, Bianchi P, Vercellati C, Micheli C, Marcello AP, Portaleone D and Zanella A (2004) A new variant of adenylate kinase (delG138) associated with severe hemolytic anemia. *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 146–149.
- 225 Travis SF, Martinez J, Garvin J, Atwater J and Gillmer P (1978) Study of a kindred with partial deficiency of red cell 2,3-diphosphoglycerate mutase (2,3-DPGM) and compensated hemolysis. *Blood*, **51**, 1107–1116.
- 226 Desnick RJ and Astrin KH (2002) Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment. *Br J Haematol*, **117**, 779–795.
- 227 Merino A, To-Figueras J and Herrero C (2006) Atypical red cell inclusions in congenital erythropoietic porphyria. *Br J Haematol*, **132**, 124.
- 228 Lamoril J, Puy H, Gouya L, Rosipal R, da Silva V, Grandchamp B *et al.* (1998) Neonatal hemolytic anemia due to inherited harderoporphyria: clinical characteristics and molecular basis. *Blood*, **91**, 1453–1457.
- 229 Mittal S, Blaylock MG, Culligan DJ, Barker RN and Vickers MA (2008) A high rate of CLL phenotype lymphocytes in autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, **93**, 151–152.
- 230 Stavroyianni N, Stamatopoulos K, Viniou M, Vaioopoulos G and Yataganas X (2001) Autoimmune hemolytic anemia during α -interferon treatment in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*, **25**, 1097–1098.
- 231 Steer JA, Tasker S, Barker EN, Jensen J, Mitchell J, Stocki T *et al.* (2011) A novel hemotropic mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clin Infect Dis*, **53**, e147–e151.
- 232 Mahlaoui N, Pellier I, Mignot C, Jais JP, Bilhou-Nabéra C, Moshous D *et al.* (2013) Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, **121**, 1510–1516.
- 233 Packman CH (2008) Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev*, **22**, 17–31.
- 234 Farolino DL, Rustagi PK, Currie MS, Doebelin TD and Logue GL (1986) Teardrop-shaped red cells in autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*, **21**, 415–418.
- 235 Pettit JE, Scott J and Hussein S (1976) EDTA dependent red cell neutrophil rosetting in autoimmune hemolytic anaemia. *J Clin Pathol*, **29**, 345–346.

- 236 Ervin DM, Christian RM and Young L (1950) Dangerous universal donors. *Blood*, **5**, 553–567.
- 237 Garratty G and Petz LD (2007) Direct antiglobulin test negative autoimmune haemolytic anaemia associated with fludarabine/cyclophosphamide/rituximab therapy. *Br J Haematol*, **139**, 622–623.
- 238 Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, Andrews T, Choi JK, Greenbaum BH *et al.* (2005) Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*, **105**, 2443–2448.
- 239 Petz LD (2008) Cold antibody autoimmune haemolytic anemias. *Blood Rev*, **22**, 1–15.
- 240 Wehbe E and Moore TA (2008) Cold agglutinin-associated hemolytic anemia due to brucellosis: first case report. *Am J Hematol*, **83**, 685–686.
- 241 Sivakumaran M, Murphy PT, Booker DJ, Wood JK, Stampo R and Sohol RJ (1999) Paroxysmal cold haemoglobinuria caused by non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, **105**, 278–279.
- 242 Bharadwaj V, Chakravorty S and Bain BJ (2011) The cause of sudden anemia revealed by the blood film. *Am J Hematol*, **87**, 520.
- 243 Gregory GP, Opat S, Quach H, Shortt J and Tran H (2011) Failure of eculizumab to correct paroxysmal cold hemoglobinuria. *Ann Hematol*, **90**, 989–990.
- 244 Jordan WS, Prouty RL, Heinle RW and Dingle JH (1952) The mechanism of hemolysis in paroxysmal cold hemoglobinuria. *Blood*, **7**, 387–403.
- 245 Sokol RJ, Hewitt S and Stamps BK (1983) Autoimmune hemolysis: mixed warm and cold antibody type. *Acta Haematol*, **69**, 266–274.
- 246 Arndt OA and Garratty G (2005) The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic anemia. *Semin Hematol*, **42**, 137–144.
- 247 Bauer P, Bellou A and El Kouch S (1998) Acute intravascular haemolysis after pollen ingestion. *Ann Intern Med*, **129**, 72–73.
- 248 Radhakrishnan K, Tan C and Gallo J (2008) Erythrophagocytosis in haemolytic disease of the newborn. *Am J Hematol*, **83**, 679.
- 249 Koenig JM and Christensen RD (1989). Neutropenia and thrombocytopenia in infants with Rh hemolytic disease. *J Pediatr*, **114**, 625–631.
- 250 Davies NP, Buggins AGS, Snijders AJM, Noble PN, Layton DM and Nicolaides KH (1992) Fetal leucocyte count in rhesus disease. *Arch Dis Child*, **67**, 404–406.
- 251 Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA and Roberts IAG (1998) Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med*, **338**, 798–803.
- 252 Wagner T, Bernaschek G and Geissler G (2000) Inhibition of megakaryopoiesis by Kell-related antibodies. *N Engl J Med*, **343**, 72.
- 253 Gaines AR (2000) Acute hemoglobinemia and/or hemoglobinúria and sequelae following Rh^(D) immune globulin intravenous administration in immune thrombocytopenic purpura patients. *Blood*, **95**, 2523–2529.
- 254 Bolan CD, Childs RW, Proctor JL, Barrett JA and Leitman SF (2001) Massive immune haemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility. *Br J Haematol*, **112**, 787–795.
- 255 Bader-Meunier B, Croisille L, Ledeist F, Rince P, Miélot F, Fabre M *et al.* (1997) Dyserythropoiesis and hemolytic anemia as initial presentation of Fas deficiency conditions. *Blood*, **90**, Suppl 1, 316a.
- 256 Schulman I, Pierce M, Lukens A and Currimbhoy Z (1960) Studies on thrombopoiesis I. A factor in normal human plasma required for platelet production, chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*, **16**, 943–957.
- 257 Upshaw JD (1978) Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **298**, 1350–1352.
- 258 Remuzzi G, Ruggenenti P, Codazzi D, Noris M, Caprioli J, Locatelli G and Gridelli B (2003) Combined kidney and liver transplantation for familial haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, **359**, 1671–1672.
- 259 Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti E, Bettinaglio P *et al.* (2006) Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*, **108**, 1267–1279.
- 260 Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T *et al.* (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, **103**, 129–135.
- 261 Geraghty MT, Perlman EJ, Martin LS, Hayflick SJ, Casella JF, Rosenblatt DS and Valle D (1992) Cobalamin C defect associated with hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*, **120**, 934–937.
- 262 Riggs SA, Wray NP, Waddell CC, Rossen RD and Gyorkor F (1982) Thrombotic thrombocytopenic purpura complicating Legionnaires' disease. *Arch Intern Med*, **142**, 2275–2280.
- 263 Case Records of the Massachusetts General Hospital (1997) A 43-year-old woman with rapidly changing pulmonary infiltrates and markedly increased intracranial pressure. *N Engl J Med*, **337**, 1149–1156.
- 264 Schröder St, Spyridopoulos I, König J, Jaschonek KG, Luft D and Seif FJ (1995) Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) associated with a *Borrelia burgdorferi* infection. *Am J Hematol*, **50**, 72–73.
- 265 Communicable Disease Report (2000) Active surveillance for rare and serious diseases in children. *CDR Weekly*, **10**, 349 and 352.
- 266 Allford SL, Hunt BJ, Rose P and Machin SJ, on behalf of the Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (2003) Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. *Br J Haematol*, **120**, 556–573.
- 267 Selleng K, Warkentin TE, Greinacher A, Morris AM, Walker IR, Heggveit HA *et al.* (2007) Very severe thrombocytopenia and fragmentation hemolysis mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura

- associated with a giant intracardiac vegetation infected with *Staphylococcus epidermidis*: role of monocyte procoagulant activity induced by bacterial supernatant. *Am J Hematol*, **82**, 766–771.
- 268 Kuperman AA, Baidousi A, Nasser M, Braester A and Nassar F (2010) Microangiopathic anemia of acute brucellosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, **2**, e2010031.
- 269 Quinn DK, Quinn J, Conlon PJ and Murphy PT (2013) A case of leptospirosis presenting as TTP. *Am J Hematol*, **88**, 337.
- 270 Matsuda Y, Hara J, Miyoshi H, Osugi Y, Fujisaki H, Takai K *et al.* (1999) Thrombotic microangiopathy associated with reactivation of human herpesvirus 6 following high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in young children. *Bone Marrow Transplant*, **24**, 919–923.
- 271 Turner RC, Chaplinski TI and Adams HG (1986) Rocky Mountain spotted fever presenting as thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med*, **81**, 153–157.
- 272 Kwaan HC (1987) Miscellaneous secondary thrombotic microangiopathy. *Semin Hematol*, **24**, 141–147.
- 273 Nishiura T, Miyazaki Y, Oritani K, Tominaga N, Tomiyama Y, Katagiri S *et al.* (1986) *Aspergillus* vegetative endocarditis complicated with schizocytic hemolytic anemia in a patient with acute lymphocytic leukemia. *Acta Haematol*, **76**, 60–62.
- 274 Meir BM, Amital H, Levy Y, Kneller A and Bar-Dayan Y (2000) *Mycoplasma-pneumoniae*-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol*, **103**, 112–115.
- 275 Fassas AB-T, Buddharaju LN, Rapoport A, Cottler-Fox M, Drachenberg C, Meisenberg B and Tricot G (2001) Fatal disseminated adenoviral infection associated with thrombotic thrombocytopenic purpura after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma*, **42**, 801–804.
- 276 Brown RC, Blecher TE, French EA and Toghill PJ (1973) Thrombotic thrombocytopenic purpura after influenza vaccination. *BMJ*, **ii**, 303.
- 277 George JN (2000) How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **96**, 1223–1229.
- 278 Koujouiri K, Vesely SK and George JN (2001) Quinine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: frequency, clinical features, and long-term outcomes. *Ann Intern Med*, **135**, 1047–1051.
- 279 Leach JW, Pham T, Diamandidis D and Georg JN (1999) Thrombotic thrombocytopenic purpura—hemolytic uremic syndrome (TTP-HUS) following treatment with deoxycytosine in a patient with cutaneous T-cell lymphoma (Sézary syndrome): a case report. *Am J Hematol*, **61**, 268–270.
- 280 Hankey GT (2000) Clopidogrel and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*, **356**, 269–270.
- 281 Humphreys BD, Sharman JP, Henderson JM, Clark JW, Marks PW, Rennke HG *et al.* (2004) Gemcitabine-associated thrombotic microangiopathy. *Cancer*, **100**, 2664–2670.
- 282 Kwaan HC and Gordon LI (2001) Thrombotic microangiopathy in the cancer patient. *Acta Haematol*, **106**, 52–56.
- 283 Mach-Pascual S, Samii K and Beris P (1996) Microangiopathic hemolytic anemia complicating FK506 (tacrolimus) therapy. *Am J Hematol*, **52**, 310–312.
- 284 McCarthy LJ, Porcu P, Fausel CA, Sweeney CJ and Danielson CFM (1998) Thrombotic thrombocytopenic purpura and simvastatin. *Lancet*, **352**, 1284–1285.
- 285 Kupfer Y and Tessler S (1997) Ticlopidine and thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, **337**, 1245.
- 286 Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR *et al.* (2000) Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med*, **342**, 1773–1777.
- 287 Case Records of the Massachusetts General Hospital (1999) A 54-year-old woman with acute renal failure and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, **340**, 1900–1909.
- 288 Lipton JH and Minden M (1995) CML may not be part of HUS. *Am J Hematol*, **49**, 100–101.
- 289 Masokoane SI (2000) Dangers of uninformed use of “African Pitocine”. 24th World Congress of Medical Technology, Vancouver, Canada.
- 290 Maguire RB, Stroncek DF and Campbell AC (1993) Recurrent pancytopenia, coagulopathy, and renal failure associated with multiple quinine-dependent antibodies. *Ann Intern Med*, **119**, 215–217.
- 291 Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, Fitzgerald DJ and Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy cell leukemia. *N Engl J Med*, **345**, 241–247.
- 292 Fujita H, Takemura S, Hyo R, Tanaka M, Koharazawa H, Fujisawa S *et al.* (2003) Pulmonary embolism and thrombotic thrombocytopenic purpura in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Leuk Lymphoma*, **44**, 1627–1629.
- 293 Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J *et al.* (2008) VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, **358**, 1129–1136.
- 294 Amjad AI and Parikh RA (2013) Opana-ER used the wrong way: intravenous abuse leading to microangiopathic hemolysis and a TTP-like syndrome. *Blood*, **122**, 3403.
- 295 Musa MA, Nounou R, Sahovic E, Seth P, Qadi A and Aljurf M (2000) Fulminant thrombotic thrombocytopenic purpura in two patients with systemic lupus erythematosus and phospholipid autoantibodies. *Eur J Haematol*, **64**, 433–435.
- 296 Salyer WR, Salyer DC and Heptinstall RH (1973) Scleroderma and microangiopathic hemolytic anemia. *Ann Intern Med*, **78**, 895–897.
- 297 Brunning RD, Jacob HS, Brenckman WD, Jimenez-Pasquau F and Goetz FC (1976) Fragmentation hemolysis in patients with severe diabetic angiopathy. *Br J Haematol*, **34**, 283–289.

- 298 Silva VA (1995) Thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome secondary to pancreatitis. *Am J Clin Pathol*, **103**, 519.
- 299 Cho YU, Chi HS, Park CJ, Jang S, Cho YM and Park JS (2009) A case of light chain deposition disease involving kidney and bone marrow with microangiopathic hemolytic anemia. *Korean J Lab Med*, **29**, 384–389.
- 300 Stepien KM, Prinsloo P, Hitch T, McCulloch TA and Sims R (2011) Acute renal failure, microangiopathic haemolytic anemia, and secondary oxalosis in a young female patient. *Int J Nephrol*, 2011, 679160.
- 301 Kaplon M, Karnad A, Mehata J and Krishnan J (1999) Left atrial myxoma complicated by microangiopathic haemolytic anemia (MAHA). *Blood*, **94**, Suppl. 1, Part 2, 6b.
- 302 Fairley S and Ihle BU (1986) Thrombotic microangiopathy and acute renal failure associated with arteriography. *BMJ*, **293**, 922–923.
- 303 Rauch AE, Tartaglia AP, Kaufman B and Kausel H (1984) RBC fragmentation and thymoma. *Arch Intern Med*, **144**, 1280–1282.
- 304 Paré PD, Chan-Yan C, Wass H, Hooper R and Hogg JC (1983) Portal and pulmonary hypertension with microangiopathic hemolytic anemia. *Am J Med*, **74**, 1093–1096.
- 305 Zuber NP and Echikson AB (1982) Giant cell arteritis and microangiopathic hemolytic anemia. *Am J Med*, **73**, 928–930.
- 306 Batton D, Amanullah A and Cornstock C (2000) Fetal schistocytic hemolytic anemia and umbilical vein varix. *J Pediatr Hematol Oncol*, **22**, 259–261.
- 307 Gudena M, Schmotzer J, Dopriak M, Novoa R and Morgan R (2004) Microangiopathic hemolytic anemia (MHA) associated with acute rheumatic valvulitis. *Blood*, **104**, 5b–6b.
- 308 Hayes AM, Redington AN and Rigby ML (1992) Severe haemolysis after transcatheter duct occlusion: a non-surgical remedy. *Br Heart J*, **67**, 321–322.
- 309 Nand S, Bansal VK, Kozeny G, Vertuno L, Remlinger KA and Jordan JV (1985) Red cell fragmentation syndrome with the use of subclavian hemodialysis catheters. *Arch Intern Med*, **145**, 1421–1423.
- 310 Steinhorn RH, Isham-Schopt B, Smith C and Green TP (1989) Hemolysis during long-term extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr*, **115**, 625–630.
- 311 Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M *et al.*; HUS Investigation Team (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*, **365**, 1771–1780.
- 312 Green DA, Murphy WG and Uttley WS (2000) Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors. *Clin Lab Haematol*, **22**, 11–14.
- 313 Visudhiphan S, Piankijagum A, Sathayapraser P and Mitrchai N (1983) Erythrocyte fragmentation in disseminated intravascular coagulation and other disease. *N Engl J Med*, **309**, 113.
- 314 Allford SA and Machin SJ (1999) Thrombotic thrombocytopenic purpura: current concepts. *CME Bull Haematol*, **2**, 80–84.
- 315 Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH *et al.*; International Council for Standardization in Haematology (ICSH) (2012) ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol*, **34**, 107–116.
- 316 Lesesve JF, Asnafi V, Braun F and Zini G (2012) Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exclude schistocytes on the blood film. *Int J Lab Hematol*, **34**, 566–576.
- 317 Casebook of the Medical Protection Society.
- 318 Amare M, Lawson B and Larsen WE (1972) Active extrusion of Heinz bodies in drug-induced haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, **23**, 215–219.
- 319 Mitchell TR and Pegrum GD (1972) The oxygen affinity of haemoglobin in chronic renal failure. *Br J Haematol*, **21**, 463–472.
- 320 Zieve L (1958) Jaundice, hyperlipidemia and hemolytic anemia: a heretofore unrecognized syndrome associated with alcoholic fatty liver and cirrhosis. *Ann Intern Med*, **48**, 471–496.
- 321 Melrose WD, Bell PA, Jupe DML and Baikie MJ (1990) Alcohol-associated haemolysis in Zieve's syndrome: a clinical and laboratory study of five cases. *Clin Lab Haematol*, **12**, 159–169.
- 322 Bain BJ (1999) Images in haematology: Heinz body haemolytic anaemia in Wilson's disease. *Br J Haematol*, **104**, 647.
- 323 Hudson PR, Tandy SC, Child DF, Williams CP and Cavill I (2001) Compensated haemolysis: a consistent feature of diabetes mellitus. *Br J Haematol*, **113**, Suppl. 1, 47.
- 324 Swann IL and Kendra JR (1998) Anaemia, vitamin E deficiency and failure to thrive in an infant. *Clin Lab Haematol*, **20**, 61–63.
- 325 Eyssette-Guerreau S, Bader-Meunier B, Garçon L, Guittion C and Cynober T (2006) Infantile pyknocytosis: a cause of haemolytic anaemia of the newborn. *Br J Haematol*, **133**, 439–442.
- 326 Kaiser U and Barth N (2001) Haemolytic anaemia in a patient with anorexia nervosa. *Acta Haematol*, **106**, 133–135.
- 327 Placzek MM and Gorst DW (1987) T activation haemolysis and death after blood transfusion. *Arch Dis Child*, **62**, 743–744.
- 328 Isbister GK, Little M, Cull G, McCoubrie D, Lawton P, Szabo F *et al.* (2007) Thrombotic microangiopathy from Australian brown snake (*Pseudonaja*) envenoming. *Intern Med J*, **37**, 523–528.
- 329 Hillmen P and Richards SJ (2000) Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, **108**, 470–479.
- 330 Yamashita M, Ueda E and Kinoshita T (1990) Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *N Engl J Med*, **323**, 1184–1189.

- 331 Schreiber ZA (1999) Hemolytic anemia associated with hepatitis C infection. *Blood*, **94**, Suppl. 1, 7b.
- 332 Lanzkowsky P, McKenzie D, Katz S, Hoffenberg R, Friedman R and Black E (1967) Erythrocyte abnormality induced by protein malnutrition. II. 51-chromium labelled erythrocyte studies. *Br J Haematol*, **13**, 639–649.
- 333 Woodruff AW, Topley E, Knight R and Downie CGB (1971) The anaemia of Kala Azar. *Br J Haematol*, **22**, 319–329.
- 334 Wickramasinghe SN (1997) Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol*, **98**, 788–787.
- 335 Delaunay J and Iolascon A (2000) The congenital dyserythropoietic anaemias. *Baillière's Clin Haematol*, **12**, 691–705.
- 336 Wickramasinghe SN and Wood WG (2005) Advances in the understanding of the congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol*, **131**, 431–436.
- 337 Parsons SF, Jones J, Anstee DJ, Judson PA, Gardner B, Wiener E *et al.* (1994) A novel form of congenital dyserythropoietic anemia associated with deficiency of erythroid CD44 and a unique blood group phenotype [In(a-b-), Co(a-b-)]. *Blood*, **83**, 860–868.
- 338 Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC *et al.* (2010) A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet*, **87**, 721–727.
- 339 McCann SR, Firth R, Murray N and Temperley IJ (1980) Congenital dyserythropoietic anaemia type II (HEMPAS): a family study. *J Clin Pathol*, **33**, 1197–1201.
- 340 Brien WF, Mant MJ and Etches WS (1985) Variant congenital dyserythropoietic anaemia with ringed sideroblasts. *Clin Lab Haematol*, **7**, 231–237.
- 341 Jankovic M, Sansone G, Comer V, Iolascon A and Masera G (1993) Atypical hereditary ovalocytosis associated with dyserythropoietic anemia. *Acta Haematol*, **89**, 35–37.
- 342 Bianchi P, Pelissero G, Bredi E, Zappa M, Vercellati C, Boscetti C *et al.* (1998) Two cases of atypical congenital dyserythropoietic anaemia (type II) presenting with laboratory features of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, **102**, 300.
- 343 Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM and Weiss MJ (2000) Familial dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in *GATA1*. *Nat Genet*, **24**, 266–270.
- 344 Freson K, Devriendt K, Matthijs G, Van Hoof A, De Vos R, Thys C *et al.* (2001) Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel *GATA1* mutation. *Blood*, **98**, 85–92.
- 345 Liljeholm M, Irvine AF, Vikberg AL, Norberg A, Month S, Sandström H *et al.* (2003) Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, *KIF23*. *Blood*, **121**, 4791–4799.
- 346 Bethlenfalvay NC, Hadnagy CS and Heimpel H (1985) Unclassified type of congenital dyserythropoietic anaemia (CDA) with prominent peripheral erythroblastosis. *Br J Haematol*, **60**, 541–550.
- 347 Heimpel H, Wilts H, Hirschmann WD, Hofman WK, Siciliano RD, Steinke B and Weschler JG (2007) Aplastic crisis as a complication of congenital dyserythropoietic anemia type II. *Acta Haematol*, **117**, 115–118.
- 348 Yeh SP, Chiu CF, Lee CC, Peng CT, Kuan CY and Chow KC (2004) Evidence of parvovirus B19 infection in patients of pre-eclampsia and eclampsia with dyserythropoietic anaemia. *Br J Haematol*, **126**, 428–433.
- 349 Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Hert-erich S, Dietrich R *et al.* (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*, **98**, 126–135.
- 350 Cassinat B, Guardiola P, Chevret S, Schlageter M-H, Tobert M-E, Rain J-D and Gluckman E (2000) Constitutive elevation of serum alpha-fetoprotein in Fanconi anemia. *Blood*, **96**, 859–863.
- 351 Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M *et al.* (2006) Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*, **107**, 1308–1314.
- 352 Da Costa L, Chanoz-Poulard G, Simansour M, French M, Bouvier R, Prieur F *et al.* (2013) First de novo mutation in RPS19 gene as the cause of hydrops fetalis in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hematol*, **88**, 160.
- 353 Freedman MH (2000) Diamond-Blackfan anaemia. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 591–606.
- 354 Fargo JH, Kratz CP, Giri N, Savage SA, Wong C, Backer K *et al.* (2013) Erythrocyte adenosine deaminase: diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, **160**, 547–554.
- 355 Karsten J, Anker AP and Odink RJ (1996) Glycosylated haemoglobin and transient erythroblastopenia of childhood. *Lancet*, **347**, 273.
- 356 Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, Kasperaviciute D, Iskander D, Game L *et al.* (2013) Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, **162**, 530–536.
- 357 Alter B (2003) Inherited bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D and Look AT (eds), *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 6th edn, Saunders, Philadelphia.
- 358 Johansson PL, Safai-Kutti S and Kutti J (2005) An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol*, **129**, 701–705.
- 359 Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R-M *et al.* (2007) Leukocytosis as

- a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*, **109**, 2446–2452.
- 360 Bonicelli G, Abdulkarim K, Mounier M, Johansson P, Rossi C, Jooste V *et al.* (2013) Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythemia vera; a population-based study of 327 patients. *Br J Haematol*, **160**, 251–254.
 - 361 Silver RT, Chow W, Orazi A, Arles SP and Goldsmith SJ (2013) Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. *Blood*, **122**, 1881–1886.
 - 362 Messiney M, Westwood NB, El-Hemaidi I, Marsden JT, Sherwood RS and Pearson TC (2002) Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. *Br J Haematol*, **117**, 47–53.
 - 363 Carneskog J, Kutti J, Wadenvik H, Lundberg P-A and Lindstedt G (1998) Plasma erythropoietin by high detectability immunoradiometric assay in untreated patients with polycythemia rubra vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol*, **60**, 278–282.
 - 364 McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green AR, Harrison C, Hunt B *et al.*, On behalf of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (2005) Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythemia/erythrocytosis. *Br J Haematol*, **130**, 166–173.
 - 365 Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Tefferi A and Birgegard G (2008) Polycythemia vera. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* (eds), *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, IARC, Lyon.
 - 366 Alvarez-Larrán A, Ancochea A, Angona A, Pedro C, García-Pallarols F, Martínez-Avilés L *et al.* (2012) Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, **97**, 1704–1707.
 - 367 Tey S-K, Cobcroft R, Grimmett K, Marlton P, Gill D and Mills A (2004) A simplified endogenous erythroid colony assay for the investigation of polycythemia. *Clin Lab Haematol*, **26**, 115–122.
 - 368 Carneskog J, Safai-Kutti S, Suurkula M, Wadenvik H, Bake B, Lindstedt G and Kutti J (1998) The red cell mass, plasma erythropoietin and spleen size in apparent polycythemia. *Eur J Haematol*, **62**, 43–48.
 - 369 Roberts I, Stanworth S and Murray NA (2008) Thrombocytopenia in the neonate. *Blood Rev*, **22**, 173–186.
 - 370 Germeshausen M, Ballmaier M and Welte K (2001) Implications of mutations in hematopoietic growth factor receptor genes in congenital cytopenias. *Ann NY Acad Sci*, **938**, 305–320.
 - 371 Thompson AA and Nguyen LT (2000) Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with *HOXA11* mutation. *Nat Genet*, **26**, 397–398.
 - 372 Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, Nguyen LT and Schanen NC (2001) Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *Br J Haematol*, **113**, 866–870.
 - 373 Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, Gresele P, Iolascon A, Pulcinelli FM and Savoia A (2003) Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*, **89**, 325–329.
 - 374 Lutskiy MI, Sasahara Y, Kenney DM, Rosen FS and Remold-O'Donnell E (2002) Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood*, **100**, 2763–2768.
 - 375 Ho LL, Ayling J, Prosser I, Kronenberg H, Iland H and Joshua D (2001) Missense C168T in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene is a common mutation in X-linked thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **112**, 76–80.
 - 376 Notarangelo LD, Mazza C, Gilliani S, d'Aria C, Gandellini F, Locatelli MG *et al.* (2002) Missense mutations of the *WASP* gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*, **99**, 2268–2269.
 - 377 Jackson N, Mohammad S, Zainal N, Jamaluddin N and Hishamuddin M (1995) Autosomal dominant thrombocytopenia with microthrombocytes: a family study. *Med J Malaysia*, **50**, 421–424.
 - 378 Geddis AE (2005) Congenital cytopenias. The molecular basis of congenital thrombocytopenias: insights into megakaryopoiesis. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 299–305.
 - 379 Geddis AE (2013) Inherited thrombocytopenias: na approach to diagnosis and management. *Int J Lab Hematol*, **35**, 14–25.
 - 380 Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A *et al.* (2001) *c-mpl* mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*, **97**, 139–146.
 - 381 Drachman JG (2004) Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood*, **103**, 390–398.
 - 382 Gandhi ML, Cummings CL and Drachman JG (2003) *FLJ14813*: a candidate for autosomal dominant thrombocytopenia on chromosome 10. *Hum Hered*, **55**, 66–70.
 - 383 Savoia A, Del Vecchio M, Totaro A, Perrotta S, Amendola G, Moretti A *et al.* (1999) An autosomal dominant thrombocytopenia gene maps to chromosomal region 10p. *Am J Hum Genet*, **65**, 1401–1405.
 - 384 Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G *et al.* (2011) Mutations in *ANKRD26* are responsible for a frequente form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*, **117**, 6673–6680.
 - 385 Pecci A and Balduini CL (2014) Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*, **165**, 179–192.
 - 386 Buijs A, Poddighe P, van Wijk R, van Solinge W, Borst E, Verdonck L *et al.* (2001) A novel *CBFA2* single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood*, **98**, 2856–2858.
 - 387 Hayward CP, Cramer EM, Kane WH, Zheng S, Bouchard M, Masse JM and Rivard GE (1997)

- Studies of a second family with the Quebec platelet disorder: evidence that the degradation of the alpha-granule membrane and its soluble contents are not secondary to a defect in targeting proteins to alpha-granules. *Blood*, **89**, 1243–1253.
- 388 van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Bussel J, de Haas M, von dem Borne AEGK (2002) Three parameters, plasma thrombopoietin levels, plasma glyocalicin levels and megakaryocyte culture, distinguish between different causes of congenital thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **117**, 390–398.
- 389 Morison IM, Cramer Bordé EM, Cheesman EJ, Cheong PL, Holyoake AJ, Fichelson S *et al.* (2008) A mutation of human cytochrome *c* enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nature Genet*, **40**, 387–389.
- 390 Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M *et al.* (2013) Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol*, **160**, 521–529.
- 391 Dasouki MJ, Rafi SK, Olm-Shipman AJ, Wilson NR, Abhyankar S, Ganter B *et al.* (2013) Exome sequencing reveals a thrombopoietin ligand mutation in a Micronesian family with autosomal recessive aplastic anemia. *Blood*, **122**, 3440–3449.
- 392 Favier R, Jondeau K, Boutard P, Grossfeld P, Reinert P, Jones C *et al.* (2003) Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb Haemost*, **90**, 893–897.
- 393 Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, del Vecchio M, Perrotta S *et al.* (2001) Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood*, **97**, 1330–1335.
- 394 Noris P, Perrotta S, Bottega R, Pecci A, Melazzini F, Civaschi E *et al.* (2012) Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb α (Bolzano mutation). *Haematologica*, **97**, 82–88.
- 395 Davies JK, Telfer P, Cavenagh JD, Foot N and Neat M (2003) Autoimmune cytopenias in the 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Lab Haematol*, **25**, 195–197.
- 396 Ghevaert C, Salsmann A, Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Rankin A, Garner SF *et al.* (2008) A nonsynonymous SNP in the *ITGB3* gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the α IIb $\beta 3$ integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood*, **111**, 3407–3414.
- 397 Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M *et al.* (2011) Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb $\beta 3$ receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood*, **117**, 5479–5484.
- 398 Drouin A, Favier R, Massé J-M, Debili N, Schmitt A, Elbin C *et al.* (2001) Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood*, **98**, 1382–1391.
- 399 White JG (2006) Localization of a lysosomal enzyme in platelets from patients with the White platelet syndrome. *Platelets*, **17**, 231–249.
- 400 White JG, Pakzad K and Meister L (2012) The York platelet syndrome: a fourth case with unusual pathologic features. *Platelets*, **24**, 44–50.
- 401 Di Pumpo M, Noris P, Pecci A, Savoia A, Seri M, Ceresa IF and Balduini CL (2005) Defective expression of GPIb/IX/V complex in platelets from patients with May-Hegglin anomaly and Sebastian syndrome. *Haematologica*, **87**, 943–947.
- 402 Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, Tanaka T, Tsurusawa M, Furukawa Y *et al.* (2001) Mutations in the NMMHCA gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood*, **97**, 1147–1149.
- 403 Bellucci S (1997) Megakaryocytes and inherited thrombocytopenias. *Baillière's Clin Haematol*, **10**, 149–162.
- 404 Toren A, Rozenfeld-Granot G, Rocca B, Epstein CJ, Amariglio N, Laghi F *et al.* (2000) Autosomal-dominant giant platelet syndromes: a hint of the same genetic defect as in Fechtner syndrome owing to a similar genetic linkage to chromosome 22q11-13. *Blood*, **96**, 3447–3451.
- 405 Erice JG, Perez JM and Pericas FS (1999) Homozygous form of the Pelger-Huet anomaly. *Haematologica*, **84**, 748.
- 406 Phillips JD, Steensma DP, Pulsipher MA, Spangrude GJ and Kushner JP (2007) Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in *GATA1*: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood*, **109**, 2618–2621.
- 407 Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH and Raskind WH (2002) X-linked thrombocytopenia with thalassaemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, **100**, 2040–2045.
- 408 Willig T-N, Breton-Gorius J, Elbin C, Mignotte V, Kaplan C, Mollicone R *et al.* (2001) Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigens on leukocytes. *Blood*, **97**, 826–828.
- 409 Harris VK, Nair SC, Dolley D, Amelia SM and Chandy M (2002) Asymptomatic constitutional macrothrombocytopenia among West Bengal blood donors. *Br J Haematol*, **117**, Suppl. 1, 88.
- 410 Becker PS, Clavell LA and Beardsley DS (1998) Giant platelets with abnormal surface glycoproteins: a new familial disorder associated with mitral valve insufficiency. *J Pediatr Hematol Oncol*, **20**, 69–73.
- 411 Fabris F, Fagioli F, Basso G and Girolami A (2002) Autosomal dominant macrothrombocytopenia with ineffective thrombopoiesis. *Haematologica*, **87**, ELT27.

- 412 Nurden P, Gobbi G, Nurden A, Enouf J, Youlyouze-Marfak I, Carubbi C *et al.* (2010) Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease type 2B. *Blood*, **115**, 2649–2656.
- 413 Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M and Saito H (2009) Mutation of the β 1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood*, **113**, 458–461.
- 414 Nurden P, Debili N, Coupry I, Bryckaert M, Youlyouze-Marfak I, Solé G *et al.* (2011) Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*, **118**, 5928–5937.
- 415 Yufu Y, Ideguchi H, Narishige T, Suematsu E, Toyoda K, Nishimura J *et al.* (1990) Familial macrothrombocytopenia associated with decreased glycosylation of platelet membrane glycoprotein IV. *Am J Hematol*, **33**, 271–273.
- 416 Gilman AL, Sloan E, White JG and Sacher R (1995) A novel hereditary macrothrombocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*, **17**, 296–305.
- 417 Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, Schäffer AA, Salzer U, Diestelhorst J *et al.* (2009) A syndrome with congenital neutropenia and mutations in *G6PC3*. *N Engl J Med*, **360**, 32–43.
- 418 Pujol-Moix N, Kelley MJ, Hernandez A, Muniz-Diaz E and Espanol I (2004) Ultrastructural analysis of granulocyte inclusions in genetically confirmed MYH9-related disorders. *Haematologica*, **89**, 330–337.
- 419 Lubinsky MS, Kahler SG, Speer IE, Hoyne HE, Kirillova IA and Lurie IW (1994) von Willebrand syndrome: a variable perinatally lethal syndrome of multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet*, **52**, 272–278.
- 420 Braddock SR and Carey JC (1994) A new syndrome: congenital thrombocytopenia, Robin sequence, agenesis of the corpus callosum, distinctive facies and developmental delay. *Clin Dysmorphol*, **3**, 75–81.
- 421 Arias S, Penchaszadeh VB, Pinto-Cisternas J and Larrauri S (1980) The IVIC syndrome: a new autosomal dominant complex pleiotropic syndrome with radial ray hypoplasia, hearing impairment, external ophthalmoplegia, and thrombocytopenia. *Am J Med Genet*, **6**, 25–59.
- 422 Pecci A, Noris P, Invernizzi R, Savoia A, Seri M, Ghiggeri GM *et al.* (2002) Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *Br J Haematol*, **117**, 164–157.
- 423 Sun XH, Wang ZY, Yang HY, Cao LJ, Su J, Yu ZQ *et al.* (2013) Clinical, pathological, and genetic analysis of ten patients with MYH9-related disease. *Acta Haematol*, **129**, 106–113.
- 424 Yagi H, Matsumoto M, Ishizashi H, Kinoshita S, Konno M, Matsui T *et al.* (2000) Plasmas with Upshaw-Schulman syndrome, a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease, augment the aggregation of normal washed platelets under high-shear-stress. *Blood*, **96**, 630a.
- 425 Noris P, Klersy C, Zecca M, Arcaini L, Pecci A, Melazzini F *et al.* (2009) Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, **7**, 2131–2136.
- 426 Fabris F, Cordiano I, Steffan A, Ramon R, Scandellari R, Nichol JL and Girolami A (2000) Indirect study of thrombopoiesis (TPO, reticulated platelets, glycofibrin) in patients with hereditary macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol*, **64**, 151–156.
- 427 Devine DV, Currie MS, Rosse WF and Greenberg CS (1987) Pseudo-Bernard-Soulier syndrome: thrombocytopenia caused by autoantibody to platelet glycoprotein Ib. *Blood*, **70**, 428–431.
- 428 Murphy MF and Williamson LM (2000) Antenatal screening for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: an evaluation using the criteria of the UK National Screening Committee. *Br J Haematol*, **111**, 726–732.
- 429 Qasim W, Gilmour KC, Heath S, Ashton E, Cranston T, Thomas A *et al.* (2001) Protein assays for diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Br J Haematol*, **113**, 861–863.
- 430 Kunishima S, Yoshinari M, Nishio H, Ida K, Miura T, Matsushita T *et al.* (2007) Haematological characteristics of MYH9 disorders due to MYH9 R702 mutations. *Eur J Haematol*, **78**, 220–226.
- 431 Neylon AJ, Saunders PWG, Howard MR, Proctor SJ and Taylor PRA on behalf of the Northern Region Haematology Group (2003) Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. *Br J Haematol*, **122**, 966–974.
- 432 Terrell DR, Beebe LA, Neas BR, Vesely SK, Segal JB and George JN (2012) Prevalence of primary immune thrombocytopenia in Oklahoma. *Am J Hematol*, **87**, 848–852.
- 433 Koh K-R, Yamane T, Ohta K, Hino M, Takubo T and Tatsumi N (1999) Pathophysiological significance of simultaneous measurement of reticulated platelets, large platelets and serum thrombopoietin in non-neoplastic thrombocytopenic disorders. *Eur J Haematol*, **63**, 295–301.
- 434 Rosthøj S, Hedlund-Treutiger I and Zeller B on behalf of the Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Working Group (2005) Factors predicting development of chronic disease in Nordic children with acute onset of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, **130**, 148–149.
- 435 Rajan SK, Espina BM and Liebman HA (2005) Hepatitis C virus-related thrombocytopenia: clinical and laboratory characteristics compared with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, **129**, 818–824.

- 436 British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force (2003) Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol*, **120**, 574–596.
- 437 García-Suárez J, Burgaleta C, Hernanz N, Albarran F, Tobaruela P and Alvarez-Mon M (2000) HCV-associated thrombocytopenia: clinical characteristics and platelet response after recombinant $\alpha 2b$ -interferon therapy. *Br J Haematol*, **110**, 98–103.
- 438 Kuga T, Kohda K, Koike K, Matsunaga T, Kogawa K, Kanisawa Y *et al.* (2001) Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and secondary autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood*, **98**, 520a.
- 439 Jarque I, Andrea R, Llopis I, de la Rubia J, Gomis F, Senent L *et al.* (2001) Absence of platelet response after eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, **115**, 1002–1003.
- 440 Petrov V, Vdovin V and Svirin P (2004) Vaccine-associated immune thrombocytopenic purpura in childhood. *Br J Haematol*, **125**, Suppl. 1, 50.
- 441 Su C and Brandt LJ (1995) *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans. *Ann Intern Med*, **123**, 698–714.
- 442 Scully M, Miller R, Cohen H, Roedling S, Starke R, Edwards S *et al.* (2005) Treatment of HIV associated thrombotic thrombocytopenic purpura – importance of prompt diagnosis. *Br J Haematol*, **129**, Suppl. 1, 12.
- 443 Weinberg PD, Bennett CL, Rozenberg-Ben-Drot K, Kwaan HC and Green D (1997) Ticlopidine associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, **90**, Suppl. 1, 462a.
- 444 Schirron CA, Berghaus TM and Sackmann M (1999) Thrombotic thrombocytopenic purpura after Ecstasy-induced acute liver failure. *Ann Intern Med*, **130**, 163.
- 445 Rachmani R, Avigdor A, Youkka M, Raanani P, Zilber M, Ravid M and ben-Bassat I (1998) Thrombotic thrombocytopenic purpura complicating chronic myelogenous leukemia treated with interferon- α . *Acta Haematol*, **100**, 204–206.
- 446 Schech SD, Brinker A, Shatin D and Burgess M (2006) New-onset and idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: incidence, diagnostic validity, and potential risk factors. *Am J Hematol*, **81**, 657–663.
- 447 Burns ER, Lou Y and Pathak A (2004) Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, **75**, 18–21.
- 448 Idowu M and Reddy P (2013) Atypical thrombotic thrombocytopenic purpura in a middle-aged woman who presented with a recurrent stroke. *Am J Hematol*, **88**, 237–239.
- 449 Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A *et al.* (2004) Familial essential thrombocythaemia associated with a dominant-positive activating mutation of the *c-MPL* gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, **103**, 4198–4200.
- 450 Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE and Schuh A (2012) Germline *JAK2* mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med*, **366**, 967–969.
- 451 Stuhmann M, Bashawri L, Ahmed MA, Al-Awamy BH, Kühnau W, Schmidtk J and El-Harith EA (2001) Familial thrombocytosis as a recessive, possibly X-linked trait in na Arab family. *Br J Haematol*, **112**, 616–620.
- 452 Cohen N, Almozni-Sarafian D, Weissgarten J, Alon I, Zaidenstein R, Dishy V *et al.* (1997) Benign familial microcytic thrombocytosis with autosomal dominant transmission. *Clin Genet*, **52**, 47–50.
- 453 van Dijken PJ, Woldendorp KH and van Wouwe JP (1996) Familial thrombocytosis in infancy presenting with a leukaemoid reaction. *Acta Paediatr*, **85**, 1132–1134.
- 454 Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R *et al.* (2007) Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and *Jak2* mutation status. *Blood*, **109**, 2310–2313.
- 455 Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ *et al.* (2005) *JAK2*^{V617F} mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and longterm prognostic relevance. *Br J Haematol*, **131**, 208–213.
- 456 Green A, Campbell P, Scott L, Buck G, Wheatley K, East C *et al.* (2005) *JAK2* V617F mutation identified a biologically distinct subtype of essential thrombocythaemia which resembles polycythaemia vera. *Blood*, **106**, 77a.
- 457 Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G and Harrison C (2006) The presence of the *JAK2* V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*, **132**, 244–245.
- 458 Passamonti F, Randi ML, Rumi E, Pungolino E, Elena C, Pietra D *et al.* (2007) Increased risk of pregnancy complications in patients with essential thrombocythemia carrying the *JAK2* (617V>F) mutation. *Blood*, **110**, 485–489.
- 459 Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD *et al.* (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, **369**, 2379–2390.
- 460 Kiladjian J-J, Elkassas N, Hetet G, Balitrand N, Conejero C, Giraudier S *et al.* (2005) Analysis of *JAK2* mutation in essential thrombocythaemia (ET) patients with monoclonal and polyclonal X-chromosome inactivation patterns (XCIPs). *Blood*, **106**, 732a.
- 461 Picardi M, Martinelli V, Cancia R, Soscia E, Morante R, Sodano A *et al.* (2002) Measurement of spleen volume by ultrasound scanning in patients with thrombocytosis: a prospective study. *Blood*, **99**, 4228–4230.
- 462 Quigley M, Linfesty RL, Bethel K and Sharpe R (2007) Stubby elliptocytes are an invariable feature of leukoerythroblastosis. *Blood*, **109**, 2666.

- 463 Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA and Tefferi A (2005) Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol*, **128**, 42–48.
- 464 Tefferi A and Elliott MA (2000) Serious myeloproliferative reactions associated with the use of thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, **96**, 4007.
- 465 Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY et al. (2005) The JAK2^{V617F} tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*, **131**, 320–328.

CAPÍTULO 9

Distúrbios dos leucócitos

Distúrbios adquiridos que afetam principalmente os leucócitos podem ser reacionais a doenças não hematológicas ou podem ser neoplásicos. Distúrbios neoplásicos originam-se de proliferação clonal de células hematopoéticas indiferenciadas, multipotentes, mieloides ou linfoides, que sofreram mutação. Distúrbios genéticos dos leucócitos foram descritos com as alterações morfológicas respectivas no Capítulo 3; quando associados a distúrbios eritroides e plaquetários, no Capítulo 8. Alterações numéricas dos leucócitos foram discutidas no Capítulo 6. No presente capítulo, são descritas as alterações típicas do hemograma nos distúrbios reacionais, seguidas pelos aspectos característicos das neoplasias hematológicas.

Alterações reacionais dos leucócitos

Infecções bacterianas

Infecções bacterianas aguda e crônica

Hemograma

No adulto, a resposta mais comum à infecção bacteriana é a neutrofilia, com desvio à esquerda, granulocitose tóxica, corpos de Döhle e, em casos de infecção grave, vacuolização citoplasmática (Figura 9.1).

Algumas vezes, são vistas bactérias dentro de neutrófilos (ver Figs. 3.174-3.175). Em infecções graves, podem ser vistos no sangue periférico mielócitos, promielócitos e, muito raramente, até mesmo células blásticas. Há redução das contagens de linfócitos e eosinófilos. A elevação da contagem de monócitos ocorre depois da elevação da contagem de neutrófilos. Durante a recuperação, há um aumento da contagem de eosinófilos, algumas vezes acima do normal. Persistindo a infecção, surge anemia normocítica e normocrômica; se a infecção se tornar crônica, comumente desenvolvem-se hipocromia e microcitose progressivas. Há um aumento da formação de *rouleaux* e da coloração de fundo. A contagem de plaquetas frequentemente eleva-se nas infecções agudas ou nas crônicas graves, mas, às vezes, há trombocitopenia. Infecções bacterianas podem, raramente, desencadear síndrome hemofagocítica, com pancitopenia.

Na sepse avassaladora, sobretudo em alcoolistas e em recém-nascidos, a infecção pode associar-se a leucopenia e neutropenia paradoxais. Apesar disso, há desvio à esquerda e alterações tóxicas. Neutropenia em pacientes bacteriêmicos indica pior prognóstico [1]. Em infecções que na maioria das vezes causam neutrofilia, a neutropenia pode

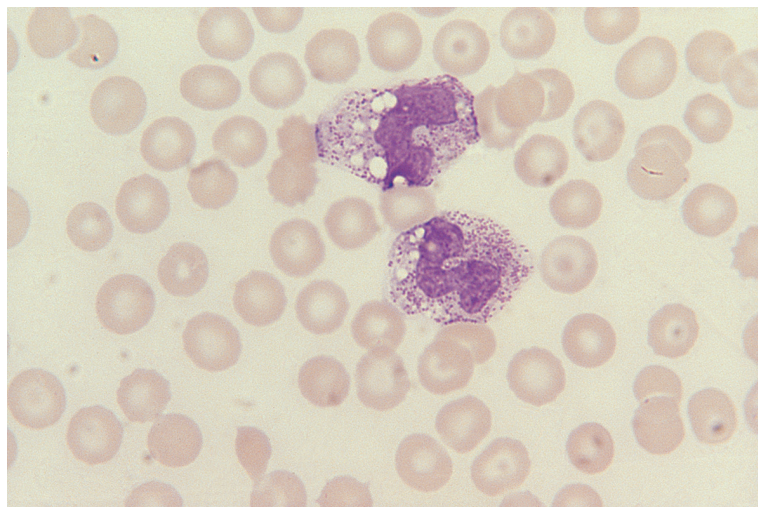


FIGURA 9.1 Distensão de sangue periférico com neutrofilia reativa, mostrando dois neutrófilos bastonados com vacuolização e grosseiras granulações tóxicas.

decorrer de aumento da marginação dos neutrófilos, de redução da granulocitopoese ou da migração de neutrófilos do sangue periférico para os tecidos em número maior do que a possibilidade de reposição, devido à escassez das reservas da medula óssea. Em alguns estudos em recém-nascidos, o desvio à esquerda pareceu mais útil do que a neutrofilia como indicativo de infecção. Em outros trabalhos, entretanto, o aumento de neutrófilos bastonados não se mostrou mais preditivo de hemocultura positiva do que a contagem global de neutrófilos [2].

Embora a resposta característica à infecção bacteriana seja a neutrofilia, isso não é invariável. Certas infecções caracterizam-se por contagem de leucócitos normal ou até mesmo por leucopenia e neutropenia, como a febre tifoide, a brucelose e as riquetsioses. A febre tifoide também pode causar anemia, trombocitopenia isolada, bicitopenia e pancitopenia. Brucelose às vezes causa trombocitopenia isolada. Linfocitose é característica da coqueluche. Crianças pequenas algumas vezes respondem a outras infecções bacterianas com linfocitose em vez de neutrofilia.

Além da elevação da contagem de leucócitos, os instrumentos automatizados podem indicar desvio à esquerda, granulócitos imaturos ou aumento da atividade de peroxidase dos neutrófilos.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial de alterações neutrófilas sugestivas de infecção deve ser feito com as demais causas de neutrofilia (ver Capítulo 6). Granulações

tóxicas e corpos de Döhle não são específicos de infecção, sendo também observados na gestação, em doenças inflamatórias e autoimunes, depois da administração de citocinas e quando há dano ou morte de tecidos, como em consequência de cirurgia, trauma ou infarto. A vacuolização dos neutrófilos é mais específica de infecção e sugere septicemia [3]. A observação de bactérias dentro de neutrófilos em distensão feita imediatamente após a coleta pode indicar colonização de um cateter venoso (se o espécime de sangue for obtido deste), mas, afora esse caso, é específica de bacteriemia; é, entretanto, um achado raro. Neutrofilia decorrente do uso terapêutico de fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) associa-se com aspectos displásicos (Fig. 9.2); neutrofilia como parte de reação leucemoide ao mieloma múltiplo associa-se com granulações tóxicas (Figura 9.3).

No período neonatal, neutrofilia pode ser causada não apenas por infecção, mas também por hipoxia, trabalho de parto difícil, administração de ocitocina durante o parto, febre ou convulsões maternas, hipoglicemia neonatal e doença hemolítica do recém-nascido [4] (ver Capítulo 6). Até mesmo o choro pode provocar neutrofilia com leve desvio à esquerda [5].

Exames adicionais

Esses aspectos descritos no hemograma são comuns nas infecções bacterianas. Como não são específicos nem constantes, para firmar um diagnóstico definitivo, é preciso considerar o quadro clínico e

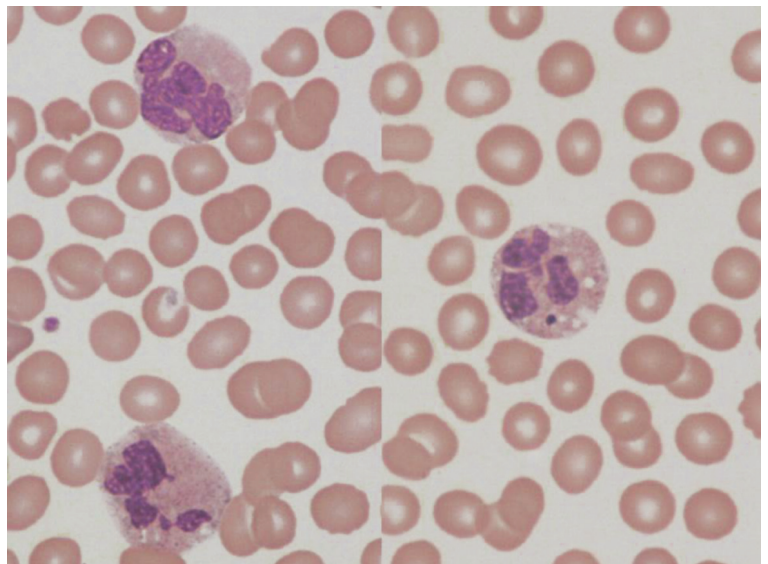


FIGURA 9.2 Imagem composta de distensões sanguíneas de paciente com neutrofilia decorrente do uso de fator estimulante de colônias granulocíticas, mostrando aspectos displásicos: núcleos de formato anormal (à esquerda) e fragmento nuclear separado (à direita).

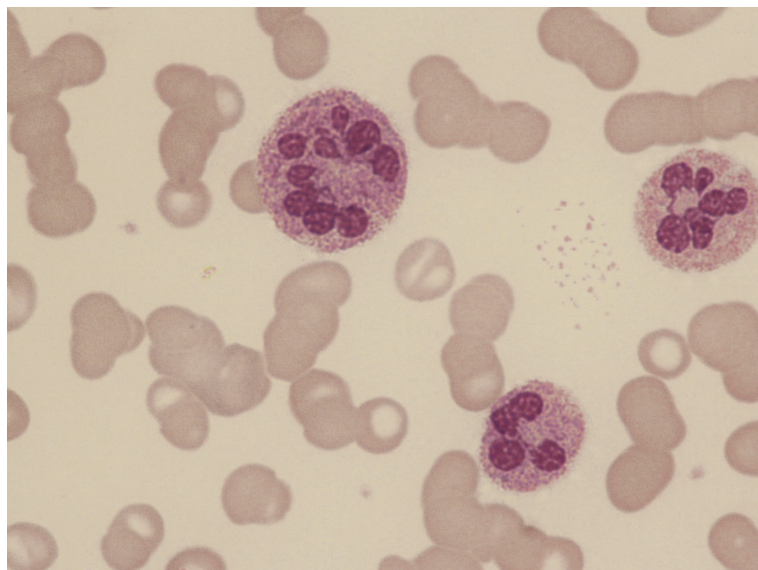


FIGURA 9.3 Distensão sanguínea de mieloma múltiplo (notar exagero na formação de *rouleaux*) e reação leucemoide neutrofílica; há um macropolícito e todos os neutrófilos mostram granulações tóxicas.

os exames bacteriológicos adequados. Em pacientes com infecção bacteriana já confirmada, pode-se empregar a contagem de neutrófilos para monitorar o progresso da doença.

Tuberculose

As manifestações hematológicas de tuberculose são proteiformes; entretanto, algumas das alterações, descritas no passado como decorrentes de tuberculose provavelmente decorriam da coexistência de outras doenças, como tricoleucemia (*hairy cell leukemia*) e mielofibrose primária.

Hemograma

A tuberculose pulmonar provoca anemia normocítica normocrômica, com aumento da formação de *rouleaux* e elevação da velocidade de sedimentação globular (VSG). Quando a doença é grave, leucocitose e neutrofilia são comuns [6]. Há linfocitose em cerca de um quarto dos pacientes, e linfopenia, em um quinto. Embora monocitose tenha sido considerada como característica da tuberculose, é observada em apenas um quarto dos pacientes, enquanto metade apresenta monocitopenia. Trombocitose é frequente. O eritrograma automatizado mostra baixa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) normal ou reduzido e aumento da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW).

Pacientes com tuberculose miliar [7] em geral são anêmicos. Ao contrário da tuberculose pulmonar aguda, a leucocitose é rara, e a leucopenia, comum. Monocitose ocorre em cerca de um quarto

dos pacientes. Linfopenia é comum. Uma minoria de pacientes apresenta pancitopenia (algumas vezes devida à hemofagocitose).

Diagnóstico diferencial

São tão variáveis as manifestações hematológicas da tuberculose que muitas condições infecciosas, inflamatórias e neoplásicas devem entrar no diagnóstico diferencial.

Exames adicionais

No diagnóstico de tuberculose miliar, o exame da medula óssea por aspiração ou biópsia pode ser útil. Hemoculturas, entretanto, podem algumas vezes também ser positivas; nesse caso, dispensa-se exame da medula.

Infecções virais

Mononucleose infecciosa

Mononucleose infecciosa é uma síndrome clínico-patológica aguda decorrente da infecção primária pelo vírus de Epstein-Barr (EBV). Em países desenvolvidos, é, predominantemente, uma doença de adolescentes e adultos jovens, ocorrendo em um a três quartos dos casos de infecção primária por EBV. É mais rara em países em desenvolvimento, pois nestes a infecção primária costuma acontecer na infância. Os aspectos clínicos usuais incluem febre, faringite, linfonodomegalias (que originaram a designação “febre glandular”), esplenomegalia e hepatite. A doença caracteriza-se pela presença no sangue de “linfócitos atípicos” ou “virócitos”, que

são linfócitos T ativados, produzidos como resposta imunológica aos linfócitos B infectados pelo EBV.

Hemograma

Há linfocitose e, em geral, leucocitose, decorrentes da presença dos linfócitos atípicos, predominantemente T-citotóxicos ativados. Critérios sugeridos para alertar o pessoal do laboratório quanto a esse diagnóstico são linfócitos acima de 50% na fórmula leucocitária e linfócitos atípicos correspondendo ao menos a 10% dos linfócitos circulantes [8]; em um estudo, o primeiro desses critérios mostrou sensibilidade de 66%, e o segundo, de 75% para a doença anticorpo heterófilo-positiva entre pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa [9]. Alguns pacientes são trombocitopênicos, e

uma minoria é anêmica. Os linfócitos atípicos são altamente pleomórficos (Figuras 9.4 e 9.5). Muitos deles são grandes, com diâmetros entre 15-30 μm , com citoplasma abundante, intensamente basófilo. Alguns apresentam grandes nucléolos centrais, parecendo imunoblastos (i.e., têm o mesmo aspecto citológico de linfócitos estimulados *in vitro* por mitógenos); outros se parecem com blastos de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Os núcleos podem ser redondos, ovais, reniformes, lobulados ou, ocasionalmente, em formato de trevo. Em um estudo, os linfócitos de 15% dos pacientes mostravam núcleo em trevo, uma observação de baixa sensibilidade, mas alta especificidade, em pacientes suspeitos de mononucleose infecciosa [9]. No mesmo estudo, em 30% dos casos, a distensão sanguínea mostrou

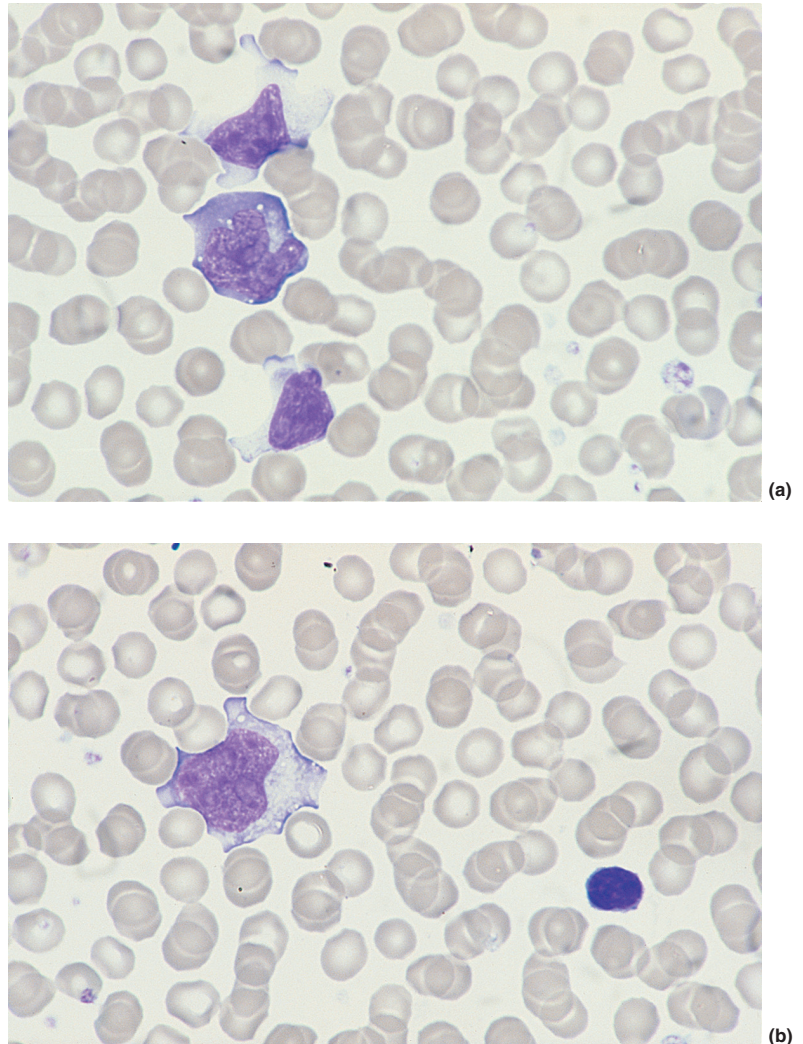


FIGURA 9.4 Distensão de sangue periférico na mononucleose infecciosa mostrando linfócitos atípicos (virócitos): (a) células pleomórficas, com citoplasma abundante, sendo que a maior delas tem citoplasma vacuolizado moderadamente basófilo e núcleo lobulado com um nucléolo; e (b) um linfócito pequeno normal e um linfócito atípico com citoplasma volumoso e bordas indentadas pelos eritrócitos circundantes.

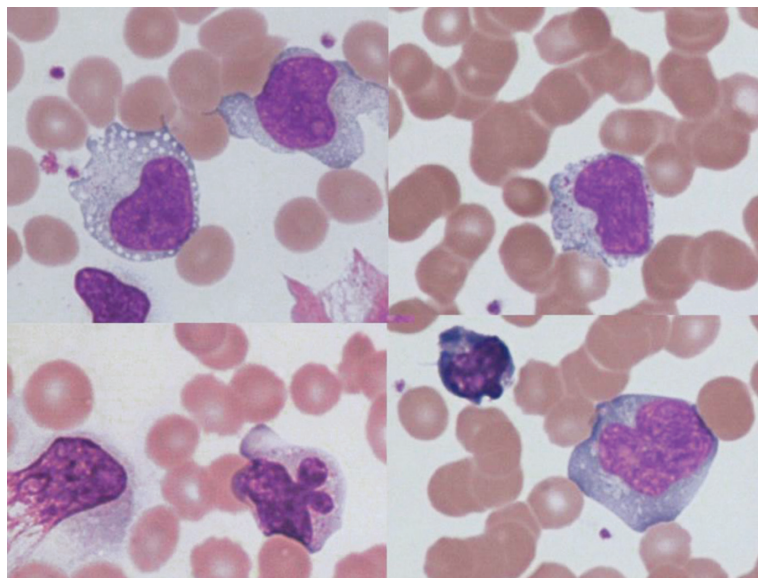


FIGURA 9.5 Imagem composta de distensões sanguíneas de mononucleose infecciosa, mostrando dois linfócitos atípicos, um deles vacuolizado (no alto, à esquerda); um grande linfócito granular atípico (no alto, à direita); uma célula amassada e um linfócito com núcleo em trevo (embaixo, à esquerda) e um linfócito apoptótico e um grande linfócito atípico (embaixo, à direita).

células amassadas, um achado também altamente específico nesse grupo de pacientes [9]. O padrão de cromatina pode ser difuso ou parcialmente condensado. O citoplasma pode ser vacuolizado, espumoso, algumas vezes granulado e de moderada a fortemente basófilo. A basofilia citoplasmática pode ser generalizada ou limitada à periferia. Quando os linfócitos atípicos contactam outras células, as margens citoplasmáticas parecem indentadas. Note-se que tanto a indentação como a basofilia são aspectos que podem ser compartilhados por células linfomatosas. Algumas células apresentam aspecto de espelho de mão. Podem-se observar células binucleadas e figuras mitóticas. Células apoptóticas podem estar presentes, pois a mononucleose é a principal causa de apoptose em linfócitos circulantes [10]. Pode haver aumento de linfócitos grandes e granulares e presença de alguns linfócitos plasmocitoides e plasmócitos. Em alguns pacientes, as alterações são sequenciais: inicialmente linfócitos grandes e granulares (células T CD8+ ativadas, não específicas para EBV), e a seguir linfócitos atípicos pleomórficos (específicos para EBV) [11]. As células anormais podem apresentar anormalidades citoquímicas, como positividade em bloco à coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) – geralmente um aspecto da LLA – e atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) – geralmente um aspecto da tricoleucemia; a citoquímica, entretanto, não é recomendada para o diagnóstico de mononucleose infecciosa.

São comuns alterações em outras linhagens celulares, mas tendem a ser obscurecidas pelas anormalidades dos linfócitos. Em uma série, 10% dos pacientes apresentavam contagens de neutrófilos inferiores a $1 \times 10^3/\mu\text{L}$ [12]. Ocasionalmente, a neutropenia é extrema [13]. Também pode haver neutrofilia; algumas vezes há granulações tóxicas, desvio à esquerda e corpos de Döhle; apesar dessas alterações reacionais, o escore de fosfatase alcalina dos neutrófilos (LAP) geralmente é baixo. Uma baixa da contagem de eosinófilos é comum; na convalescença, há eosinofilia. Trombocitopenia é comum, com contagem inferior a $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ em um terço dos pacientes. Trombocitopenia severa, algumas vezes, observada, deve-se à destruição imunológica das plaquetas. Pode ocorrer anemia hemolítica devida a uma crioaglutinina, notando-se, na distensão, aglutinados de eritrócitos, alguns esferócitos e, mais tarde, policromatocitose. É mais frequente haver alguma aglutinação eritrocitária sem hemólise declarada. Pacientes com esferocitose hereditária são particularmente sujeitos à hemólise durante a mononucleose infecciosa. Alguns pacientes desenvolvem citopenias intensas em consequência a hemofagocitose desencadeada pelo vírus. Uma complicação raríssima é a anemia aplástica, que se desenvolve de 1-6 semanas depois das manifestações iniciais.

Nem todos os pacientes com infecção primária pelo EBV apresentam aspectos clínico-patológicos de mononucleose infecciosa. Crianças pequenas apresentam maior linfocitose com menor porcentagem de linfócitos atípicos do que crianças de mais

idade, mas a contagem absoluta de linfócitos atípicos é semelhante em crianças com menos e com mais de 4 anos de idade [14]. Em pacientes em idade mais avançada, a linfocitose e a porcentagem de linfócitos atípicos podem ser inferiores às observadas em adolescentes e adultos jovens [15]. Raros pacientes com mononucleose infecciosa apresentam linfopenia grave [15]; nesses casos, a doença é muito mais grave e o prognóstico, pior.

Nas contagens automatizadas, geralmente há alarmes para a presença de “blasts”, de “variant lymphocytes” (linfócitos atípicos) ou de ambos. Dependendo do instrumento, pode haver um aumento de “monócitos”, “células mononucleares” ou “LUC” (Siemens Advia), ou um aumento espúrio de “basófilos”. Em um levantamento em pacientes com suspeita clínica de mononucleose infecciosa, com e sem teste positivo para anticorpos heterófilos, o alarme para “blasts” de um instrumento Coulter STKS mostrou sensibilidade de 41% para os casos positivos, enquanto o alarme “variant lymphocytes” mostrou sensibilidade de 72%. No Sysmex NE-8000, as sensibilidades foram de 43 e 16%, respectivamente [9].

Diagnóstico diferencial

Deve-se fazer o diagnóstico diferencial da mononucleose infecciosa com as demais causas de linfócitos atípicos (Tabela 9.1) e com LLA e linfomas leucêmicos.

Exames adicionais

Um hemograma sugestivo de mononucleose infecciosa é indicação para pesquisa de um anticorpo heterófilo que aglutina eritrócitos de carneiro ou de cavalo, e que difere dos anticorpos heterófilos de outras condições por ser absorvido por eritrócitos de boi, mas não por rim de cobaia. Testes rápidos em lâmina para anticorpos heterófilos, disponíveis no comércio, são sensíveis e convenientes, com uma taxa de positividade falsa de 1-2%. À apresentação, 60% dos pacientes com mononucleose infecciosa têm teste de anticorpo heterófilo positivo, e até 90% tornam-se positivos quando acompanhados cuidadosamente. Em adolescentes e adultos, “mononucleose infecciosa heterófilo-negativa” representa, na maioria das vezes, infecção por citomegalovírus (CMV) ou EBV. Em uma série, 70% dos casos representavam infecção por CMV, e 16%, infecção por EBV [30]. Em outra série, a porcentagem de pacientes com anticorpos IgM para vários vírus foi de 40% para EBV, 39% para CMV e 25% para herpes-vírus humano 6 [31], alguns pacientes

TABELA 9.1 Algumas causas de linfócitos atípicos

Infeções virais

Mononucleose infecciosa (EBV), infecção por citomegalovírus,* hepatite A,* sarampo, rubéola, infecção por ecovírus, infecção por adenovírus,* varicela e herpes-zóster, infecção por herpes simples, infecção por herpes-vírus humano 6 [17],* influenza, caxumba, meningite linfocítica (infecção por vírus da coriomeningite linfocítica), infecção por HIV, infecção por HTLV-1, síndrome pulmonar por hantavírus [18]

Infeções bacterianas

Brucelose, tuberculose, febre tifoide [19], sífilis, riquetsioses* – incluindo tifo do carrapato (*Rickettsia conorii*), tifo dos matagais (*Rickettsia tsutsugamushi*), tifo murino (*Rickettsia typhi*) [20, 21] –, infecções por *Ehrlichia* – incluindo febre Sennetsu (Japão) e erliquiose (Estados Unidos [22] –, infecção por *Mycoplasma pneumoniae*

Infeções por protozoários

Toxoplasmose*, malária, babesiose

Imunizações

Doença do soro (raramente)

Hipersensibilidade a fármacos*

Como ao ácido paraminossalicílico, sulfassalazina, fenitoína sódica, mesantoína, dapsona, fenotiazinas, estreptoquinase [23]

Linfonodopatia angioimunoblástica/linfoma angioimunoblástico de células T [24]

Lúpus eritematoso sistêmico [25]

Sarcoidose [26]

Doença do enxerto versus hospedeiro

Rejeição de enxerto

Linfoma de Hodgkin

Síndrome de Kawasaki [27]

Histiocitose hemofagocítica familiar [28]

Proliferação idiopática transitória de linfócitos monoclonais atípicos [29]

*Condições que podem estar associadas a um número de linfócitos atípicos suficientemente grande para serem confundidas com mononucleose infecciosa.

com IgM para mais de um vírus; 3% tinham toxoplasmose. Bem menos da metade dos bebês com infecção por EBV primária apresenta anticorpos heterófilos [14], sendo a infecção por EBV a causa mais frequente de mononucleose infecciosa heterófilo-negativa nessa faixa etária. Testes sorológicos para anticorpos IgM anti-EBV e anti-CMV podem esclarecer o diagnóstico nos casos negativos para anticorpo heterófilo. Testes sorológicos para toxoplasmose também são indicados, e, para grupos de alto risco, um teste para HIV deve ser considerado (ver a seguir).

Infecção por HIV e aids

Infecção por HIV provoca uma doença aguda no momento da soroconversão, seguida por uma fase de infecção latente antes do aparecimento das manifestações de infecção crônica, isto é, da síndrome de imunodeficiência adquirida (aids). Uma expansão transitória de linfócitos grandes e granulares CD8-positivos pode ocorrer quando a infecção crônica torna-se clinicamente evidente. Com menor frequência, há um aumento persistente de linfócitos grandes e granulares associado a uma síndrome que se assemelha à de Sjögren, com infiltração linfóide das glândulas salivares, pulmões e rins [32].

Hemograma

A doença aguda inicial pode assemelhar-se à mononucleose infecciosa tanto clínica quanto hematologicamente, mas o número de linfócitos atípicos (Figura 9.6) geralmente é muito menor. Após recuperação da fase aguda, a pessoa infectada torna-se hematologicamente normal, muitas vezes por vários anos. Nesse período de infecção latente, pode ocorrer uma trombocitopenia isolada, por destruição imunológica de plaquetas.

A infecção crônica está associada a uma queda progressiva da contagem de linfócitos CD4-positivos; como estes em geral são os mais numerosos, a diminuição causa uma baixa da contagem global de linfócitos. Linfocitose reacional, à custa de linfócitos CD8-positivos (incluindo linfócitos grandes e granulares CD8-positivos, CD57-positivos [32, 33]),

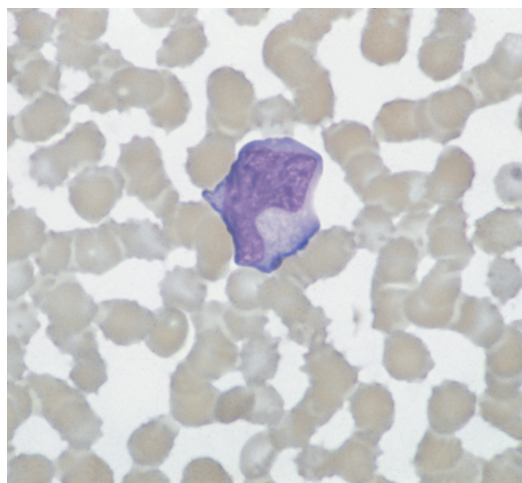


FIGURA 9.6 Sangue periférico mostrando um linfócito atípico durante infecção aguda por HIV.

pode inicialmente manter a contagem global e mascarar o declínio dos CD4-positivos. A diminuição progressiva dos linfócitos CD4-positivos associa-se a uma queda progressiva da função imunológica, que eventualmente se manifesta por infecções ou neoplasia. Quando há desenvolvimento de um número especificado de infecções ou neoplasias, diz-se que o paciente está com aids. Os aspectos hematológicos refletem tanto o efeito do HIV quanto das infecções oportunistas intercorrentes. A própria infecção por HIV causa anemia normocrômica e normocítica, trombocitopenia e neutropenia com neutrófilos displásicos; uma anormalidade característica dos neutrófilos é a presença de fragmentos destacados do núcleo [34]; formas displásicas podem incluir neutrófilos hipogranulares e pelgeroides (pseudo-Pelger) e neutrófilos com núcleos grandes e de formato anormal (Figura 9.7). Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) é uma rara complicação; nesse caso, a distensão sanguínea mostrará eritrócitos fragmentados e trombocitopenia. Infecções recorrentes contribuem para o desenvolvimento de anemia e causam formação de *rouleaux* e coloração de fundo excessiva. Alterações reacionais em alguns linfócitos são comuns e podem incluir formas em trevo. Infecções bacterianas podem causar alterações tóxicas nos neutrófilos. Infecções virais e micobacterianas podem associar-se a pancytopenia por hemofagocitose. Nos estágios finais da doença, há uma pancytopenia progressiva.

Pacientes com infecção por HIV também estão sujeitos a complicações iatrogênicas, incluindo macrocitose e pancytopenia causada por zidovudina, neutropenia por ganciclovir e anemia hemolítica pela ação oxidante da dapsona.

Em pacientes com infecção crônica por HIV, as contagens automatizadas com a série Siemens H.1 e Advia podem mostrar aumento da atividade de peroxidase dos neutrófilos e uma baixa da densidade nuclear, evidenciada pela diminuição do índice de lobularidade. Os dois aspectos sugerem granulocitopoesse displásica. Pode, ainda, haver aumento de células grandes não coradas (LUCs).

Diagnóstico diferencial

Dependendo do estágio da doença e dos aspectos hematológicos específicos, o diagnóstico diferencial deve incluir mononucleose infecciosa e outras infecções virais, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) e PTT. É importante pensar na possibilidade de infecção por HIV e fazer os testes sorológicos específicos em pacientes que apresentem qualquer desses

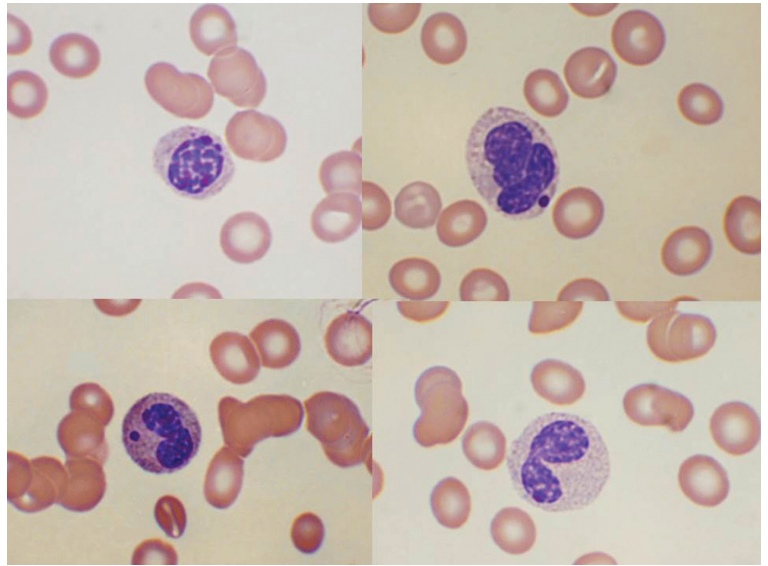


FIGURA 9.7 Imagem composta de distensão sanguínea de paciente infectado com HIV, mostrando displasia dos neutrófilos.

aspectos hematológicos. Uma expansão de linfócitos grandes e granulares pode ser confundido com leucemia de linfócitos grandes e granulares, mais ainda porque até um quarto parte dos pacientes tem evidências de expansão clonal à análise do receptor de células T [32]; o imunofenótipo das células é CD8-positivo, CD11a-positivo, CD11c-positivo e CD57-positivo, com expressão forte de HLA-DR e reações negativas para CD16 e CD56. Infecção por HIV faz parte do diagnóstico diferencial da aplasia eritroide pura, pois a deficiência imunológica pode causar falha na eliminação do parvovírus B19, de modo que a aplasia induzida por ele torna-se crônica em vez de transitória. Na doença mais avançada, pode ocorrer confusão com as síndromes mielodisplásicas (SMDs) e outras causas de insuficiência da medula óssea.

Exames adicionais

O diagnóstico é feito pela detecção sorológica de anticorpos anti-HIV. Se houver aplasia eritroide pura em paciente HIV-positivo, os testes sorológicos para o parvovírus devem ser complementados por testes para o DNA do parvovírus, pois pode haver falta de produção dos anticorpos específicos.

Outras infecções virais

Infecções virais podem ser agudas ou crônicas, produzindo efeitos variados sobre as células sanguíneas.

Hemograma

Infecções virais agudas estão associadas a anormalidades hematológicas transitórias; a mais frequente é a linfocitose com alterações reacionais dos linfócitos. Pode haver aumento de linfócitos grandes e granulares. Com alguns vírus, essas alterações podem ser suficientemente graves para simular mononucleose infecciosa (ver Tabela 9.1). Outras infecções virais agudas estão associadas à neutrofilia (ver Tabela 6.4). A contagem de eosinófilos reduz-se durante infecção aguda, elevando-se na convalescença. Durante a infecção viral ativa, pode haver trombocitopenia devida ao consumo de plaquetas. No caso das febres hemorrágicas virais, coagulação intravascular disseminada pode provocar trombocitopenia grave. Durante a convalescença de algumas infecções virais – por exemplo, da rubéola –, pode ocorrer trombocitopenia pela interação de imunocomplexos com as plaquetas. Hemólise súbita pode decorrer da formação do anticorpo de Donath-Landsteiner (anti-P) logo após algumas viroses, como o sarampo, e de crioaglutininas anti-I ou anti-i no decurso de outras viroses. Infecção pelo parvovírus em indivíduos normais provoca uma aplasia eritroide transitória, com pequena queda da Hb e desaparecimento dos reticulócitos. Em alguns pacientes, pode-se observar também neutropenia ou trombocitopenia. Em pacientes com redução da sobrevida eritroide, ocorre uma anemia muito mais grave, mas também transitória. Alguns

vírus, particularmente os herpes-vírus, desencadeiam síndrome hemofagocítica que causa pancitopenia. Infecção pelo hantavírus *Sin Nombre* associa-se a trombocitopenia no começo da doença, com o mau funcionamento cardiopulmonar grave sendo predito por um conjunto de cinco aspectos do sangue periférico – trombocitopenia, presença de mielócitos, falta de granulações tóxicas proeminentes (mesmo havendo acentuada neutrofilia), aumento do hematócrito (pseudopoliglobulia) decorrente de uma síndrome de vazamento plasmático capilar, e presença de mais de 10% de células semelhantes a imunoblastos ou plasmócitos [35]

Os efeitos das infecções virais crônicas variam conforme o vírus. Pode haver aumento de linfócitos grandes e granulares. Na infecção crônica por vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1), pode haver linfocitose com ocasionais linfócitos atípicos, inclusive alguns com núcleo em trevo (Figura 9.8). Indivíduos imunologicamente incompetentes, não apenas por infecção por HIV mas, também, por imunossupressão congênita ou iatrogênica, podem manter infecção crônica pelo parvovírus, a qual provoca uma aplasia eritroide pura crônica. Uma aparente hepatite viral (não A, não B, não C) [36], pode ser seguida por anemia aplástica. Pacientes com infecção crônica por qualquer um dos vírus da hepatite podem apresentar anormalidades hematológicas devidas à hepatopatia crônica e ao hiperesplenismo; pacientes com hepatite C podem desenvolver crioglobulinemia.

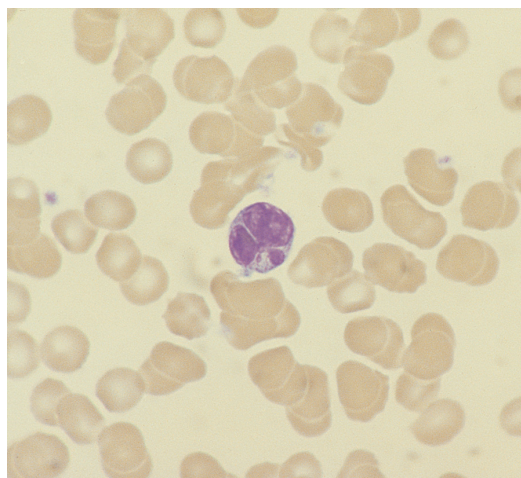


FIGURA 9.8 Distensão de sangue periférico de um portador saudável do HTLV-1, mostrando um linfócito com núcleo em formato de trevo.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial dos efeitos hematológicos das infecções virais é complexo, pois as anormalidades causadas são muito variáveis. Ele inclui as diversas condições que produzem linfocitose, linfócitos atípicos e trombocitopenia.

Exames adicionais

Devem ser feitos testes para anticorpos heterófilos e testes sorológicos para vírus específicos condizentes com o quadro clínico.

Linfocitose B policlonal persistente

É uma condição rara que ocorre quase exclusivamente em mulheres tabagistas; associa-se ao tipo tecidual HLA-DR7. Há descrição de casos familiares – em vários grupos de parentes e em 1 criança e o pai. Há suspeita, também, de associação com infecção por EBV. Uma minoria de pacientes tem hepatomegalia, esplenomegalia ou linfonodomegalias, mas a maioria só tem sintomas inespecíficos, como fadiga crônica. Raros pacientes têm volumosa esplenomegalia [37]. Há uma associação com anormalidades cromossômicas adquiridas, especificamente i(3q), trissomia 3 e duplicação(3)(q26q29) [38, 39]; essas anormalidades, curiosamente, estão presentes em linfócitos tanto com expressão de cadeias kappa (κ) quanto com expressão de cadeias lambda (λ), de modo que não podem ser consideradas indicativas de clonalidade da população afetada.

Hemograma

Os linfócitos anormais incluem linfócitos grandes e linfócitos muito basófilos, semelhantes aos linfócitos atípicos das viroses, além de linfócitos com núcleo bilobado, às vezes binucleados [40] (Figura 9.9); estes últimos são muito sugestivos desse raro distúrbio. Alguns linfócitos têm nucléolos e assemelham-se a prolinfócitos. Raramente, há aglutinação EDTA-dependente dos linfócitos [41]. O diagnóstico pode ser feito em pacientes sem linfocitose absoluta se os aspectos citológicos e os demais aspectos forem típicos; casos assim corresponderam a 20% dos pacientes em uma série [42].

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui linfocitoses reacionais e linfomas.

Exames adicionais

A imunofenotipagem é indicada para excluir proliferações linfocíticas monoclonais. Em geral, as células

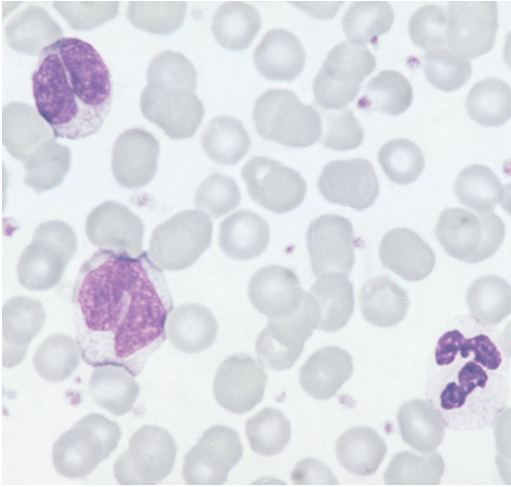


FIGURA 9.9 Sangue periférico de paciente com linfocitose B persistente, mostrando linfócitos lobulados.

expressam IgM e IgD, juntamente com marcadores pan-B (como CD19 e CD24), CD11c, CD21, CD25, CD27, CD95 e CD148 [43, 44]. A fração de linfócitos B expressando CD5 e CD23 é mais baixa do que em controles normais, FMC7 é mais alta e CD10 e CD38 geralmente não são expressos [43]. As células anormais parecem representar a expansão de uma população de linfócitos B de memória [43], possivelmente análogos a linfócitos B da zona marginal [44]. Embora a relação $\kappa:\lambda$ possa ser

anormal, a população atípica inclui tanto linfócitos com expressão de cadeias κ como de cadeias λ . A reação em cadeia da polimerase (PCR) mostra que podem estar presentes um único ou múltiplos genes de fusão *BCL2-IGH*. Frequentemente, há um aumento policlonal de IgM. Além de i(3q) (causando amplificação do gene *ATR*), têm sido constatadas *del(6q)*, +8 e *del(11q)* [42]. Pode haver infiltração linfocítica nodular ou intrassinusoidal na medula óssea [45].

Eosinofilia reacional

É comum em grande variedade de condições alérgicas e em infestações parasitárias (ver Capítulo 6). É mais rara como reação a uma neoplasia, como carcinoma ou sarcoma.

Hemograma

A eosinofilia varia de leve a acentuada. Os eosinófilos podem ser citologicamente normais ou mostrar desgranulação ou vacuolização de intensidade variável (Figura 9.10). Em distensões sanguíneas com eosinofilia, deve-se atentar para a possível presença de células linfomatosas, blastos e linfócitos atípicos. Na eosinofilia reacional que ocorre como resposta à LLA, blastos leucêmicos circulantes podem ser raros, em contrapartida ao grande número de eosinófilos. Quando os eosinófilos são degranulados podem não ser identificados pelos contadores automatizados.

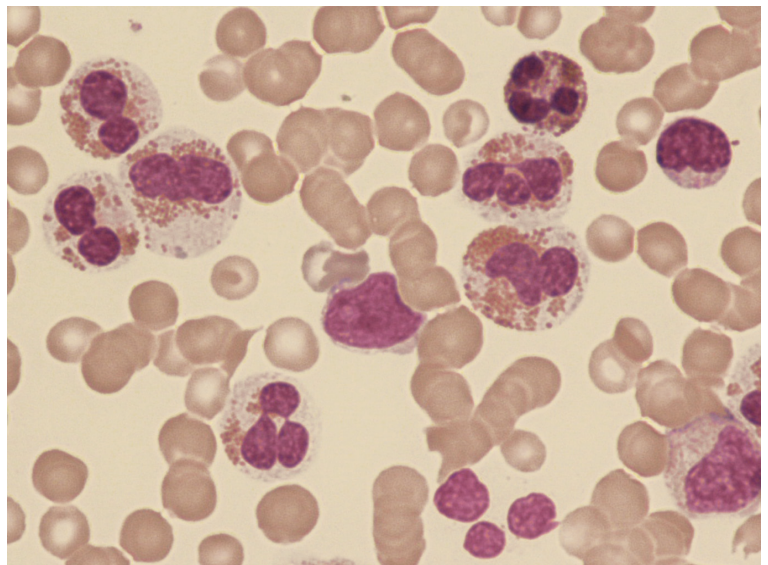


FIGURA 9.10 Distensão sanguínea de paciente com leucemia linfoblástica aguda e eosinofilia reacional. Há um linfoblasto leucêmico no meio do campo. Muitos dentre os eosinófilos são hipogranulares e alguns têm núcleo trilobado.

Diagnóstico diferencial

Deve incluir leucemia eosinofílica e síndrome hipereosinofílica idiopática. Este último diagnóstico (ver a seguir) requer que não haja evidência de uma causa subjacente.

Exames adicionais

O principal passo na investigação de uma eosinofilia acentuada (hipereosinofilia) é uma história completa, que inclua dados sobre viagens e medicamentos de uso recente, seguida de exame físico. Esses procedimentos podem fornecer pistas que orientem novas investigações. Se a hipótese de parasitose for razoável, torna-se necessária uma série de exames, cuja escolha dependerá dos locais visitados pelo paciente, dada a distribuição geográfica de muitos parasitos, das queixas clínicas e dos dados do exame físico. Investigações pertinentes em casos de eosinofilia são mostradas na Tabela 9.2.

Hipereosinofilia mediada por linfócitos T

Em certo número de pacientes com hipereosinofilia, em geral com manifestações cutâneas da

doença, demonstra-se ser a eosinofilia mediada por citocinas (como a interleuquina [IL]-5) secretadas por linfócitos T fenotipicamente aberrantes.

Hemograma

O hemograma não tem aspectos específicos. A contagem de linfócitos geralmente é normal; se estiver aumentada, deve-se suspeitar de eosinofilia decorrente de linfoma de células T.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é o mesmo que se faz para as eosinofilias reacionais.

Exames adicionais

A imunofenotipagem mostra uma população de linfócitos T com um fenótipo aberrante – por exemplo, com falta de expressão de CD3, com expressão de CD3 mas falta de CD4 ou CD8 ou com expressão aumentada ou diminuída de outros antígenos associados aos linfócitos T. O uso de um painel de anticorpos para domínios variados do receptor de células T pode fornecer evidência de clonalidade, e um rearranjo clonal do gene do receptor de células T pode ser evidenciado em cerca de metade desses pacientes. Anormalidades citogenéticas, como 6q– ou 10p–, podem ocorrer como eventos secundários. A imunoglobulina E sérica costuma estar aumentada e pode haver hipergamaglobulinemia policlonal.

Síndrome hipereosinofílica idiopática

Usa-se a expressão “síndrome hipereosinofílica (SHE) idiopática” para descrever um grupo heterogêneo de condições – caracterizadas por eosinofilia persistente inexplicada e dano tecidual, geralmente afetando o coração e o sistema nervoso – atribuível à liberação do conteúdo dos grânulos dos eosinófilos. A condição é rara, mas bem mais comum em homens. Os casos são classificados arbitrariamente como SHE idiopática quando uma eosinofilia inexplicada exceder $1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, persistir por ao menos 6 meses e associar-se a dano tecidual [47]. Alguns casos parecem dever-se a uma anormalidade dos linfócitos T, com a eosinofilia provocada por linfocinas como IL-2, IL-3, IL-5 e IL-15 [48-50] (ver anteriormente). Se os linfócitos T constituírem uma população clonal, é razoável considerar a eosinofilia como reacional a um linfoma T, patente ou oculto; se não houver clonalidade, o termo “idiopático” persiste apropriado. Outros casos podem representar uma neoplasia mieloproliferativa com diferenciação eosinofílica predominante, isto é, leucemia

TABELA 9.2 Investigações que podem ser úteis em casos de eosinofilia inexplicada

Se houver suspeita de parasitose [469]
Exame parasitológico de fezes, incluindo cistos, ovos e larvas
Exame de urina para <i>Schistosoma haematobium</i>
Biópsia retal para <i>Schistosoma mansoni</i>
Sorologia para estrogiloidíase, toxocaríase, esquistossomose, filariose e vários outros parasitos – ou testes antigênicos para cisticercose, filariose e uma variedade de outros parasitos (dependendo da história de viagem)
Pesquisa de microfilárias no sangue
Aspiração duodenal
Dosagem de imunoglobulina E
Radiografia de tórax
Biópsia de pele ou músculo
Se houver suspeita de neoplasia
Radiografia de tórax
Tomografia computadorizada ou outro método de imagem de tórax e abdômen
Aspiração e biópsia da medula óssea, com análise citogenética e molecular (pode ser feita no sangue periférico) para o gene de fusão <i>FIP1L1-PDGFR</i> A
Biópsia de linfonodo ou outro tecido
Imunofenotipagem de linfócitos do sangue periférico, ou de alguma população anormal de células no sangue ou na medula óssea
Análise do gene do receptor de células T para estabelecer clonalidade dos linfócitos T

eosinofílica; se não houver prova disso, entretanto, a classificação como “idiopática” é apropriada mais uma vez.

Hemograma

Os aspectos hematológicos da SHE idiopática persistem mal definidos, pois as séries anteriores de pacientes incluíam muitos que seriam agora reconhecidos como tendo leucemia eosinofílica. A descrição a seguir deverá ser considerada como provisória.

Há eosinofilia moderada ou acentuada. Os eosinófilos com frequência apresentam desgranulação e vacuolização acentuadas, incluindo até mesmo eosinófilos completamente agranulares (Figura 9.11). É comum a presença de grânulos menores do que os normais. Os núcleos dos eosinófilos podem ser hiperlobados, hipolobados ou em formato de anel. Outros aspectos hematológicos podem incluir anemia, anisocitose, pecilocitose (incluindo pecilócitos em gota), quadro leucoeritroblástico, basofilia, trombocitopenia, trombocitose, neutrofilia e neutrófilos com grânulos mais proeminentes, um tanto basófilos (ver Figura 3.71). Esta última anormalidade pode ser acentuada a ponto de os neutrófilos anormais serem confundidos com basófilos; pode ocorrer, também, um aumento verdadeiro de basófilos [47]. O número de eosinófilos desgranulados tem significação prognóstica: se exceder $1 \times 10^3/\mu\text{L}$, é provável que já haja dano cardíaco ou que esteja prestes a ocorrer [51].

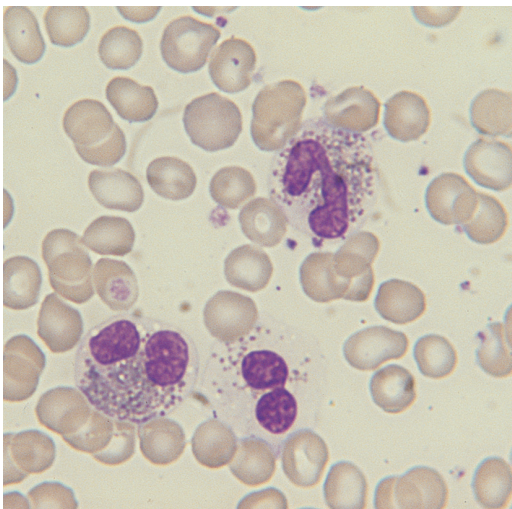


FIGURA 9.11 Distensão de sangue periférico de paciente com SHE idiopática; os três eosinófilos mostram grau variado de desgranulação.

Diagnóstico diferencial

A SHE idiopática é um diagnóstico de exclusão. O diagnóstico não pode ser feito antes da negatividade de testes para o gene de fusão *FIP1L1-PDGFR*, pois a presença deste atualmente define como de leucemia eosinofílica casos que anteriormente eram considerados idiopáticos.

Muitos dos aspectos característicos são inespecíficos. Também pode ocorrer dano tecidual devido à liberação do conteúdo dos grânulos eosinófilos, tanto na eosinofilia reacional (ver anteriormente) como na leucemia eosinofílica. Desgranulação e vacuolização dos eosinófilos também podem ser acentuadas tanto na leucemia eosinofílica quanto em eosinofilias reacionais intensas. Podem ocorrer aspectos do sangue periférico, indistinguíveis dos da SHE idiopática, em alguns pacientes que subsequentemente demonstram ter mastocitose sistêmica [52], LLA ou linfoma. Pode ser difícil, ou mesmo impossível, distinguir SHE idiopática de leucemia eosinofílica crônica (ver adiante) no início da doença.

Exames adicionais

O paciente deve ser convenientemente questionado e examinado, e devem ser feitos todos os exames para as causas conhecidas e pertinentes de eosinofilia. Se nenhuma causa for identificada, deverá ser feita imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico para identificar alguma população que expresse marcadores aberrantes [49, 50]. Se houver uma população anormal, deve ser realizada análise do gene do receptor dos linfócitos T para verificar se a população é clonal [429]. Também são indicados mielograma, biópsia de medula óssea e análise citogenética, pois a detecção de um aumento de células blásticas ou de uma anormalidade citogenética permite o diagnóstico de leucemia eosinofílica. Pelo exame da medula óssea, também se pode diagnosticar mastocitose sistêmica ou linfoma.

Embora os casos sem evidência de um clone T anormal, e sem aspectos específicos que os identifiquem como “leucemia”, devam ser classificados como SHE idiopática, alguns desses pacientes mais tarde mostram transformação da doença em leucemia mieloide aguda (LMA), comprovando que a condição era, desde o início, neoplásica. Em outros, a doença evolui para um distúrbio linfoproliferativo óbvio. Alguns pacientes falecem de consequências precoces ou tardias do dano tecidual, sem que a verdadeira natureza da doença torne-se aparente.

Reações leucemoides

Reação leucemoide é uma anormalidade hematológica que simula e pode ser confundida com leucemia, mas que, de fato, é reacional a alguma outra doença ou condição. Na reação leucemoide, as anormalidades desaparecem quando é corrigida a condição subjacente. Em muitos dos primeiros relatos de reações leucemoides, o paciente não se recuperou da doença primária; como consequência, não houve correção da anormalidade hematológica. Nesses casos, é difícil saber com certeza se o paciente teve ou não uma leucemia coexistente com outra doença. Isso aconteceu em muitos dos primeiros relatos de reações leucemoides à tuberculose. Não se deve descrever como reação leucemoide a mielopoese anormal transitória de recém-nascidos com síndrome de Down (ver adiante); trata-se de uma condição neoplásica, sendo considerada mais corretamente como uma leucemia com remissão espontânea [53]. Reações leucemoides podem ser mieloides ou linfoides.

Reações leucemoides mieloides

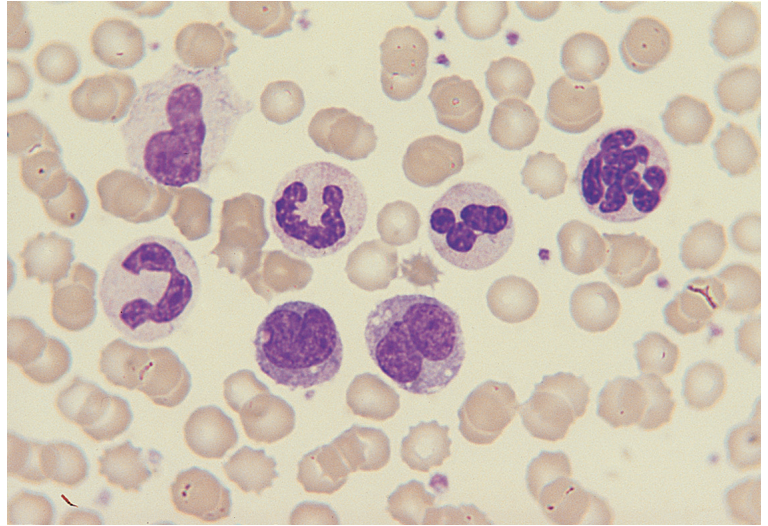
Reações leucemoides dificilmente simulam leucemia mieloide crônica (LMC), pois esta tem um espectro característico de alterações (ver adiante)

quase nunca encontrado em condições reacionais. As diferenças estão resumidas na Tabela 9.3. As leucemias mieloides com maior probabilidade de serem simuladas por uma reação leucemoide são a leucemia mieloide aguda (LMA), a leucemia mieloide crônica atípica Filadélfia-negativa, a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), a leucemia mielomonocítica (LMM) infantil, a leucemia neutrofílica e a leucemia eosinofílica. Causas de reações leucemoides mieloides incluem estímulos graves à atividade da medula óssea, como uma infecção bacteriana grave (Figura 9.12) (particularmente quando complicada por anemia megaloblástica, dano à medula induzido por álcool ou agranulocitose anterior), tuberculose, algumas viroses, hemorragia e carcinoma ou outra doença maligna (com ou sem metástases na medula óssea). Carcinomas podem causar reações leucemoides, que precedem, às vezes por anos, as outras manifestações do tumor [54]. Reações mieloides já foram descritas na LLA [55]. O diagnóstico dessas reações durante evolução de casos de LMA é problemático, geralmente requerendo estudos citogenéticos e moleculares; a administração de fatores de crescimento ou de quimioterapia em alta dose na LMA pode desencadear uma pseudorrecidiva, com células imaturas não

TABELA 9.3 Alguns aspectos que podem ser úteis para distinguir leucemia mieloide crônica (LMC) de neutrofilia reacional

Aspecto	Neutrofilia reacional	LMC
Contagem de leucócitos	Raramente > 60 × 10 ³ /μL	Geralmente 20 a 500 × 10 ³ /μL ou até mais
Desvio à esquerda	De moderado a acentuado; quando leve em relação à neutrofilia, favorece a neutrofilia reacional	Proporcional à contagem de leucócitos; pode ser acentuado
Morfologia dos leucócitos	Podem estar presentes granulação tóxica, vacuolização e corpos de Döhle	Não existem alterações tóxicas
Contagem absoluta de eosinófilos	Geralmente reduzida	Geralmente aumentada; podem estar presentes mielócitos eosinófilos
Contagem absoluta de basófilos	Geralmente reduzida	Quase invariavelmente elevada; podem estar presentes mielócitos basófilos
Contagem absoluta de monócitos	Pode estar elevada	Em geral moderadamente elevada, mas não em proporção à contagem de neutrófilos
Eritropoese	Pode haver anemia, geralmente normocítica e normocrômica, mas quando hipocrômica e microcítica favorece a neutrofilia reacional; pode haver <i>rouleaux</i>	Pode haver anemia normocítica e normocrômica
Contagem de plaquetas	Pode haver trombocitose ou trombocitopenia; se for uma trombocitose reacional, as plaquetas são geralmente pequenas	Geralmente normal ou elevada; podem estar presentes plaquetas gigantes; as plaquetas são grandes, mesmo em presença de trombocitose; podem estar presentes megacariócitos circulantes
Escore de fosfatase alcalina nos neutrófilos (LAP)	Geralmente elevado	Quase sempre reduzido

FIGURA 9.12 Distensão de sangue periférico de paciente com reação leucemoide devida a grave sepse pós-operatória por germe gram-negativo. A contagem de leucócitos foi $92 \times 10^3/\mu\text{L}$, com contagem de neutrófilos $74 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem de monócitos $16 \times 10^3/\mu\text{L}$; a distensão mostra neutrófilos, um macropolítico e monócitos com aumento da basofilia citoplasmática.



leucêmicas circulantes, mas fatores de crescimento também podem estimular a aparição de blastos da própria leucemia no sangue periférico. Reações leucemoides em recém-nascidos podem resultar de sífilis congênita [56] e, em lactentes, podem decorrer da síndrome de trombocitopenia com rádios ausentes, em particular quando complicada por hemorragia [57]. Embora já tenha sido aceito o fato de haver uma associação de mieloma múltiplo e outras neoplasias plasmocíticas com leucemia neutrofílica, parece mais provável que esses casos correspondam a reações leucemoides neutrófilas [58, 59], mediadas por G-CSF secretado pelas células mielomatosas [60]; um desses pacientes, entretanto, desenvolveu LMA 18 meses após a apresentação [61] (intervalo muito curto para leucemia induzida por agente alquilante), de modo que a natureza exata dessa condição persiste incerta. A secreção ectópica de G-CSF por outros tumores pode causar reação leucemoide neutrófila idêntica à vista no mieloma múltiplo; isso foi descrito em sarcomas e em carcinomas de pulmão, tireoide, estômago, vesícula e bexiga [60, 62, 63]. Reações leucemoides podem decorrer do uso terapêutico de fatores de crescimento, como G-CSF, fator estimulante de colônias granulocítica e macrófágica (GM-CSF) e IL-3; se a história clínica não for conhecida pela equipe do laboratório, essas reações podem ser confundidas com LMMC, LMC atípica ou leucemia eosinofílica. Em alguns casos, pode haver até 30% de mieloblastos no leucograma, simulando LMA [64].

Várias infecções em crianças podem causar reações passíveis de confusão com a LMM infantil; incluem histoplasmose, toxoplasmose e infecções por micobactérias [65], *Mycoplasma pneumoniae* [66], EBV [67], CMV [68], herpes-vírus humano 6 [69] e parvovírus B19 [70]. O hemograma na osteopetrose pode simular LMM infantil [71] (Figura 9.13).

Aspectos úteis para fazer a distinção entre leucemia e uma reação leucemoide incluem, alterações tóxicas nos neutrófilos, como granulações tóxicas e vacuolização, a preponderância de células mais maduras (em uma reação leucemoide) e neutrófilos hipogranulares e a presença de número desproporcional de mieloblastos (na maioria das leucemias). Um baixo escore de LAP é fortemente favorável ao diagnóstico de leucemia, pois o escore está quase invariavelmente elevado nas reações leucemoides. Se forem observados bastões de Auer nas células blásticas, pode-se fazer com segurança o diagnóstico de leucemia ou de SMD.

Quando os aspectos clínicos e hematológicos não permitem distinguir entre leucemia e reação leucemoide, a aspiração da medula óssea é indicada com citologia (mielograma), análise citogenética, e com microscopia e cultura para *Mycobacterium tuberculosis*.

A pseudorrecidiva resultante da administração de fatores de crescimento pode ser distinguida de recidiva real da leucemia por análise citogenética ou molecular, que demonstrará que uma anormalidade associada à leucemia já não está presente.

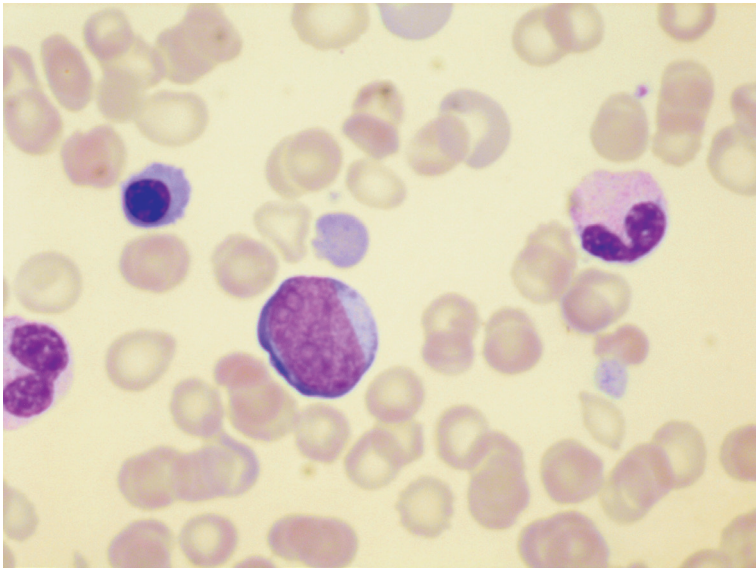


FIGURA 9.13 Distensão de sangue periférico de criança com reação leucemoide decorrente de osteopetrose de aparição precoce, mostrando um blasto, um eritoblasto e neutrófilos.

Reações leucemoides linfoides

O hemograma na coqueluche (Figura 9.14) e na linfocitose infecciosa pode simular leucemia linfocítica crônica (LLC), mas, como os aspectos clínicos e a faixa etária dessas duas doenças são totalmente diferentes, isso não constitui problema na prática. Em pacientes com linfocitose pós-esplenectomia, já têm sido feitos diagnósticos errados de LLC. Sabendo-se os altos níveis que pode atingir a contagem de linfócitos em esplenectomizados, evita-se esse problema realizando-se uma pesquisa cuidadosa na distensão de sangue periférico para

aspectos pós-esplenectomia. A linfocitose pós-esplenectomia também pode simular uma leucemia com linfócitos grandes e granulares, pois, às vezes, predomina esse tipo de célula (Figura 9.15). Linfocitose à custa de linfócitos grandes e granulares também está descrita em associação com a neutropenia autoimune induzida por rituximabe [65]. A linfocitose B policlonal persistente também pode ser confundida com LLC ou linfoma, tendo até ocasionado indicações inapropriadas de quimioterapia. O conhecimento dessa síndrome e a detecção dos aspectos citológicos característicos (ver

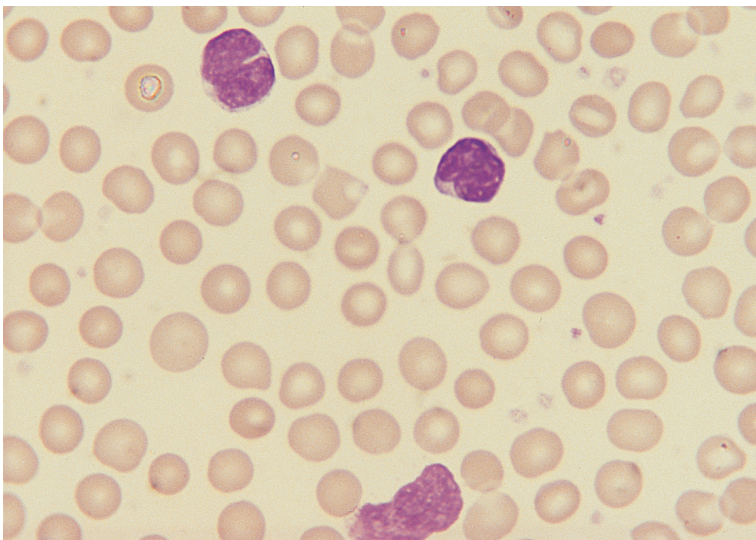


FIGURA 9.14 Distensão sanguínea de criança com coqueluche, mostrando um linfócito clivado, um linfócito normal e uma célula amassada.

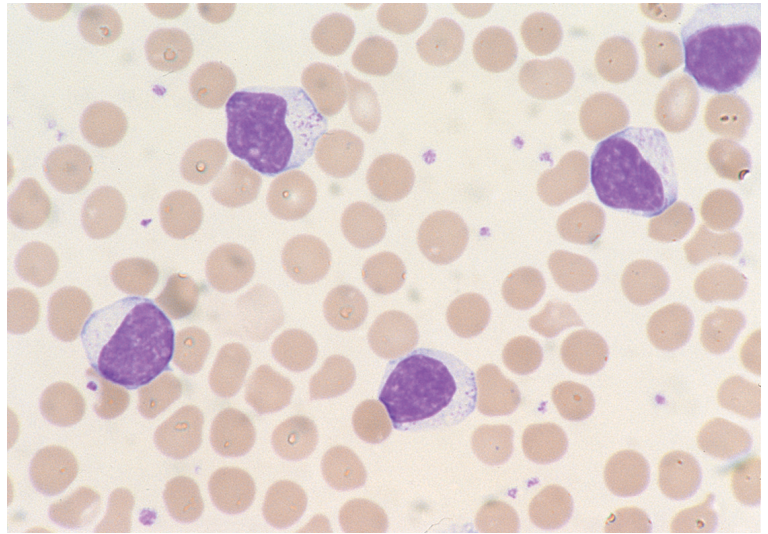


FIGURA 9.15 Distensão sanguínea em paciente esplenectomizado por esferocitose hereditária. A contagem de leucócitos foi $29,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ e a de linfócitos, $24 \times 10^3/\mu\text{L}$, com predomínio de linfócitos grandes e granulares. Cortesia do Dr. J. Houghton, Salford.

descrição anterior) permitem que se estabeleça a distinção. A esplenomegalia da malária hiper-reativa pode associar-se a linfocitose com numerosos linfócitos vilosos e, assim, simular um linfoma esplênico com linfócitos vilosos (LELV) [73]; nesses casos, a imunofenotipagem é essencial para garantir que o paciente não tem LELV, já que esse linfoma ocorre na mesma área geográfica e é possível que represente uma neoplasia resultante de estímulo antigênico crônico da malária hiper-reativa com esplenomegalia. Foram observados aspectos similares aos de leucemia por células de Sézary em um caso de reação a droga [74]. Uma plasmocitose acentuada a ponto de simular leucemia plasmocítica foi descrita em um paciente com aplasia da medula precedendo LLA [75].

Podem simular LLA: mononucleose infecciosa e outras infecções virais com linfócitos atípicos no sangue, reações a estresse grave em crianças, infecção por micoplasma [66], tuberculose e sífilis congênita. Foi descrita linfocitose com células linfoides imaturas de linhagem T em infecção aguda por HTLV-1 [76] e em erliquiose [77]. Quando houver dúvida diagnóstica, a imunofenotipagem é indispensável. Note-se, entretanto, que células linfoides fenotipicamente anormais podem aparecer no sangue durante reações leucemoides linfoides, como precursores de linfócitos B CD10-positivos ou linfócitos T coexpressando CD4 e CD8 [66].

Neutropenia congênita severa

Neutropenia congênita severa ocorre esporadicamente (a mais comum) ou, raramente, como uma

condição genética recessiva ligada ao sexo. Em alguns pacientes, é resultado de heterozigose à mutação do gene *ELANE*, em 19p13.3, que codifica a elastase dos neutrófilos. Outras mutações causais são mostradas no Capítulo 6, Tabela 6.22. Infecções graves frequentes nos 2 primeiros anos de vida são a apresentação usual, às vezes começando já no neonato com infecção do umbigo.

Hemograma

Com exceção das alterações causadas pela infecção, os poucos neutrófilos presentes são citologicamente normais. Leve anemia e trombocitose, se presentes, decorrem da infecção; pode haver monocitose e eosinofilia.

Diagnóstico diferencial

Inclui outras causas congênicas e adquiridas de neutropenia na primeira infância, particularmente neutropenia autoimune, neutropenia cíclica e síndrome de Pearson (ver Tabela 6.22).

Exames adicionais

Exame da medula óssea mostra aparente parada da mielopoese no estágio de promielócito. O diagnóstico pode ser confirmado por análise de DNA.

Neutropenia grave

Neutropenia cíclica ocorre como uma condição genética autossômica dominante ou esporadicamente, geralmente em crianças com menos de um ano de idade. É resultado de heterozigose para uma mutação do gene *ELANE*. Devido a uma regulação

anormal das células-tronco hematopoéticas, a contagem de neutrófilos varia ciclicamente com periodicidade de cerca de 21 dias, causando episódios infecciosos recorrentes.

Hemograma

Salvo pelas alterações relacionadas às infecções, os neutrófilos são citologicamente normais. Os reticulócitos e as plaquetas também podem ter uma produção com variação cíclica; às vezes, o mesmo acontece com os eosinófilos e linfócitos. A contagem de monócitos pode fazer um ciclo em fase oposta à contagem de neutrófilos.

Diagnóstico diferencial

Inclui outras causas genéticas e adquiridas de neutropenia na primeira infância.

Exames adicionais

Exame da medula óssea mostra alterações cíclicas, da parada aparente da mielopoese no estágio promielocítico, precedendo a neutropenia, a aparente maturação normal quando a contagem de neutrófilos está subindo. O diagnóstico requer contagens seriadas, 3 vezes por semana, durante o período de ao menos 2 mês, e análise genética molecular.

Neoplasias hematológicas

As neoplasias hematológicas devem ser diagnosticadas de acordo com a classificação de tumores da hematopoese e tecido linfóide da Organização Mundial da Saúde (OMS) [79].

Leucemia mieloide aguda (LMA)

A LMA é uma doença decorrente da proliferação de um clone de células mieloides indiferenciadas que mostram maturação defeituosa ou ausente. As manifestações clínicas devem-se à proliferação celular, como hepatomegalia e esplenomegalia, e à substituição da medula óssea normal, como anemia e sangramento. O clone neoplásico geralmente deriva de uma célula mieloide indiferenciada multipotente, mas, em alguns casos, pode derivar de uma célula já com comprometimento de linhagem, ou de uma célula linfóide-mieloide indiferenciada multipotente.

A LMA é subclassificada com base em aspectos do sangue periférico e da medula óssea. Durante algumas décadas, a classificação mais aceita foi a Franco-Americano-Britânica (FAB) [80-84], mas esta foi substituída pela classificação da OMS [79, 85]. Como a classificação da OMS requer

conhecimento de anormalidades citogenéticas e de biologia molecular, pode haver algum retardo até um diagnóstico definitivo; por esse motivo um diagnóstico morfológico provisório, com base na classificação FAB, persiste apropriado. Também persiste importante em locais do mundo onde citogenética e biologia molecular não estão disponíveis. A diferença mais importante entre as duas classificações é a exigência, na classificação FAB, de ao menos 30% de blastos na medula óssea para definir um diagnóstico de LMA, ao passo que na classificação da OMS o critério de definição exige uma contagem de blastos (incluindo promielócitos) no sangue periférico ou na medula óssea, igual ou acima de 20% – a menos que esteja presente uma de certas anormalidades citogenéticas especificadas. Essas classificações estão resumidas nas Tabelas 9.4 (FAB) e 9.5 (OMS). Os vários subtipos FAB de leucemia aguda estão ilustrados nas Figuras 9.16 a 9.25, e as várias categorias OMS, nas Figuras 9.26 a 9.37. Deve-se notar que a classificação da OMS é hierárquica: os casos devem ser inicialmente inseridos na categoria de “LMA e síndromes mielodisplásicas relacionadas à terapêutica”, se apropriado, depois nas demais categorias, na ordem vista na Tabela 9.5.

Hemograma

A maioria dos pacientes apresenta blastos leucêmicos no sangue periférico. Podem ser mieloblastos, monoblastos, megacarioblastos, eritroblastos primitivos ou uma população mista. Podem ser vistas algumas células em maturação. Em alguns pacientes, a célula predominante é um promielócito anormal. A maioria dos pacientes é neutropênica, mas em alguns tipos de LMA há maturação do clone leucêmico, com consequente neutrofilia ou, com menor frequência, eosinofilia e, muito raramente, basofilia. A maioria dos pacientes apresenta uma anemia normocítica normocrômica ou, se a LMA houver sido precedida por uma SMD (ver a seguir), uma anemia macrocítica. A maioria dos pacientes é trombocitopênica, mas um pequeno número apresenta contagem de plaquetas normal ou até mesmo trombocitose. As células do sangue periférico apresentam aspectos displásicos semelhantes aos das SMDs. Em uma minoria de pacientes, há citopenia, em geral pancitopenia, sem células imaturas circulantes.

Instrumentos automatizados emitem *flag* “suspect blast cells” e podem mostrar que há neutrófilos com características aberrantes.

TABELA 9.4 Classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) da leucemia mieloide aguda (LMA) [80-84]

M1 (LMA sem maturação) Blastos $\geq 90\%$ das NECs; $\geq 3\%$ de blastos positivos para peroxidase ou SBB; componente monocítico $\leq 10\%$ das NECs; componente granulocítico $\leq 10\%$ das NECs		M5 (leucemia monoblástica/monocítica aguda) M5a (sem maturação ou leucemia monoblástica aguda) Componente monocítico $\geq 80\%$ das NECs; monoblastos $\geq 80\%$ do componente monocítico M5b (com maturação ou leucemia monocítica aguda) Componente monocítico $\geq 80\%$ das NECs; monoblastos $< 80\%$ do componente monocítico	
M2 (LMA com maturação granulocítica) Blastos 30 a 89% das NECs; componente granulocítico $> 10\%$ das NECs; componente monocítico $< 20\%$ das NECs		M6 (eritroleucemia) Eritroblastos $\geq 50\%$; blastos $\geq 30\%$ das NECs	
M3 e variante M3 Morfologia característica		M7 (leucemia megacarioblástica) Demonstração de que os blastos são megacarioblastos, por exemplo, pela citotóxica ultraestrutural, indicando a presença de peroxidase das plaquetas ou por análise de marcadores imunológicos das células, indicando a presença de antígenos plaquetários	
M4 (leucemia mielomonocítica aguda) Blastos $\geq 30\%$ das NECs; componente granulocítico (inclusive mieloblastos) $\geq 20\%$ das NECs <p style="text-align: center;">E</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> Ou Componente monocítico da MO $\geq 20\%$ das NECs e contagem de monócitos do sangue $\geq 5 \times 10^3/\mu\text{L}$ </div> <div style="width: 45%;"> Ou MO parecida com M2, mas contagem de monócitos do sangue $\geq 5 \times 10^3/\mu\text{L}$ e elevação de lisozima* </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> Ou Componente monocítico da MO $\geq 20\%$ das NECs e elevação da lisozima </div> <div style="width: 45%;"> Ou MO parecida com M2, mas contagem de monócitos do sangue $\geq 5 \times 10^3/\mu\text{L}$ e demonstração citotóxica de componente monocítico na MO </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> Ou Componente monocítico da MO $\geq 20\%$ das NECs e confirmação citotóxica de componente monocítico na medula óssea† </div> <div style="width: 45%;"></div> </div>		M0 (LMA com evidências mínimas de diferenciação mieloide) Peroxidase e SBB positivos em $< 3\%$ dos blastos, mas demonstração de que os blastos são mieloides, por imunofenotipagem	

MO, medula óssea; NEC, células não eritroides; SBB, Sudan black B.

*Lisozima no soro ou urina três vezes acima do normal.

†Positivo para atividade de naftol AS acetato (NASA) esterase, inibida por fluoreto.

TABELA 9.5 Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para leucemia mieloide aguda (LMA) [85]

LMA e síndromes mielodisplásicas relacionadas a terapêutica
LMA com anormalidades citogenéticas genéticas/recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL (MLLT3-KMT2A)</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21; q26.2); <i>RPN1-EVI1 (RPN1-MECOM)</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
LMA com <i>NPM1</i> mutado
LMA com <i>CEBPA</i> mutado
LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia
Com neoplasia mielodisplásica ou mielodisplásica/mieloproliferativa prévia
Com anormalidades genéticas relacionadas a síndrome mielodisplásica
Com displasia de múltipla linhagem*
LMA fora das categorias acima
LMA minimamente diferenciada
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica e monocítica aguda
Leucemia eritroide aguda
Leucemia megacariocítica aguda
Leucemia basofílica aguda
Pan-mielose aguda com mielofibrose

*Definida pela presença de aspectos displásicos em mais de 50% das células em duas ou mais linhas celulares.

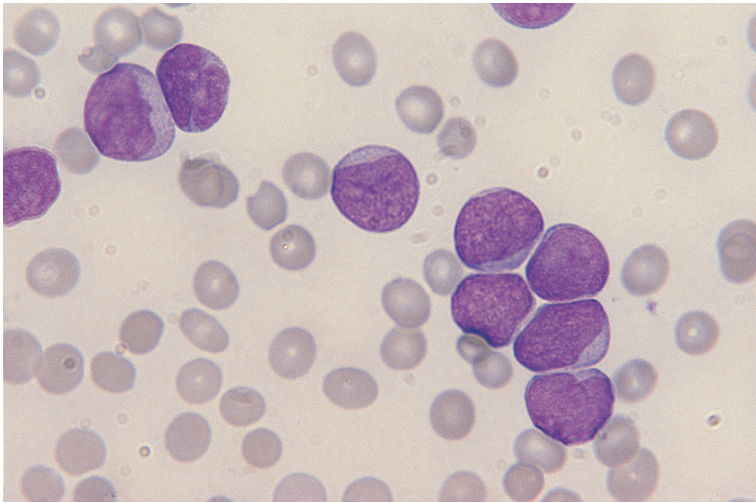


FIGURA 9.16 Distensão sanguínea em leucemia mieloide aguda (LMA) sem maturação (FAB tipo M1). As células blásticas apresentam um padrão fino de cromatina; parecem linfoblastos, apresentando nucléolos pequenos e elevada relação nucleocitoplasmática; neste paciente, apenas algumas das células blásticas apresentam grânulos azurófilos, mas a mieloperoxidase (MPO), o Sudan black B (SBB) e a cloroacetato esterase (CAE) foram positivos em elevada porcentagem de células.

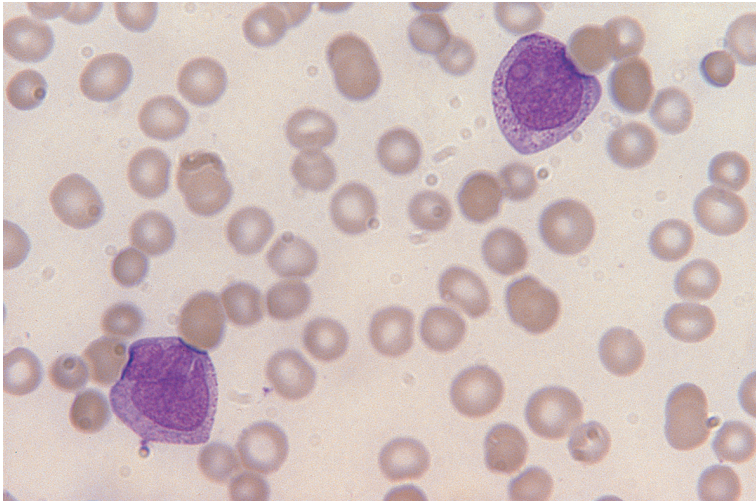


FIGURA 9.17 Distensão sanguínea em LMA com maturação (FAB tipo M2), mostrando células leucêmicas com maturação além do estágio blástico. Ambas as células são promielócitos, uma delas com núcleo de formato anormal. A diferenciação em LMA M2 pode ser neutrófila, eosinófila, basófila ou qualquer combinação desses tipos.

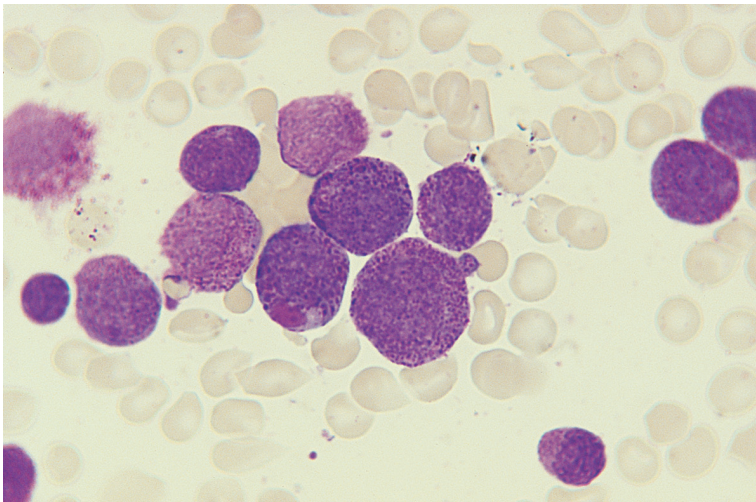
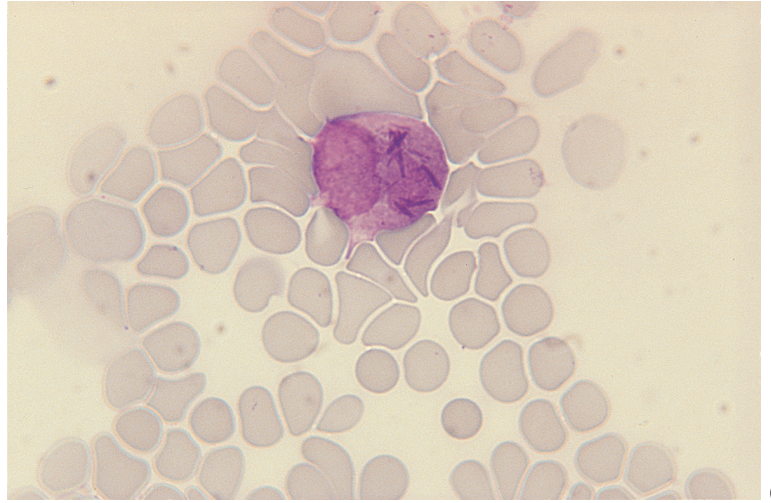


FIGURA 9.18 Distensão sanguínea de dois pacientes com leucemia promielocítica hipergranular aguda (FAB tipo M3), mostrando: (a) promielócitos hipergranulares, um deles com um grânulo gigante; (*continua*)

(a)

FIGURA 9.18 (Continuação) (b) um promielócito com poucos grânulos, mas com um feixe de bastões de Auer.



(b)

FIGURA 9.19 Distensão sanguínea em variante hipogranular (ou microgranular) de leucemia promielocítica aguda (FAB tipo M3, variante), mostrando células bilobadas características; apenas algumas células apresentam grânulos visíveis ao microscópio óptico, mas, apesar disso, houve forte positividade citoplasmática com SBB, MPO e CAE.

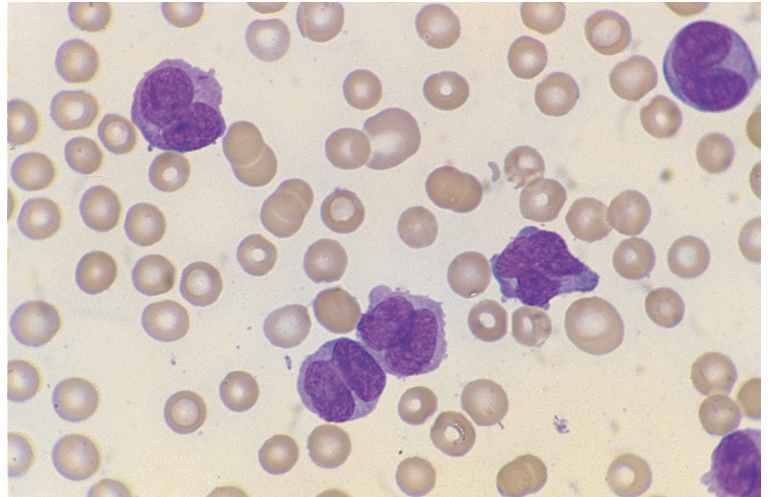
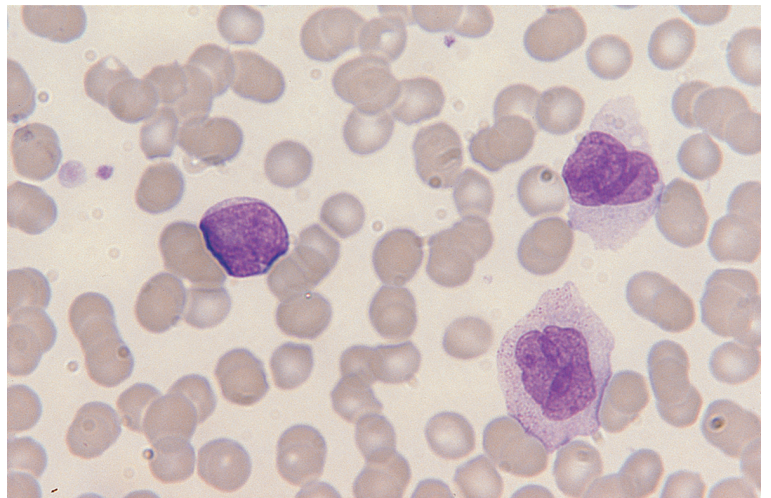


FIGURA 9.20 Distensão sanguínea de paciente com leucemia mielomonocítica aguda (FAB tipo M4), mostrando um mieloblasto e dois monoblastos; os monoblastos são grandes com núcleo lobulado, padrão rendilhado fino de cromatina, vários nucléolos e citoplasma volumoso finamente granulado, enquanto o mieloblasto é menor, com maior relação núcleo-citoplasmática. Na LMA M4, a diferenciação granulocítica pode ser neutrófila, eosinófila (ver Figura 9.21) ou basófila.



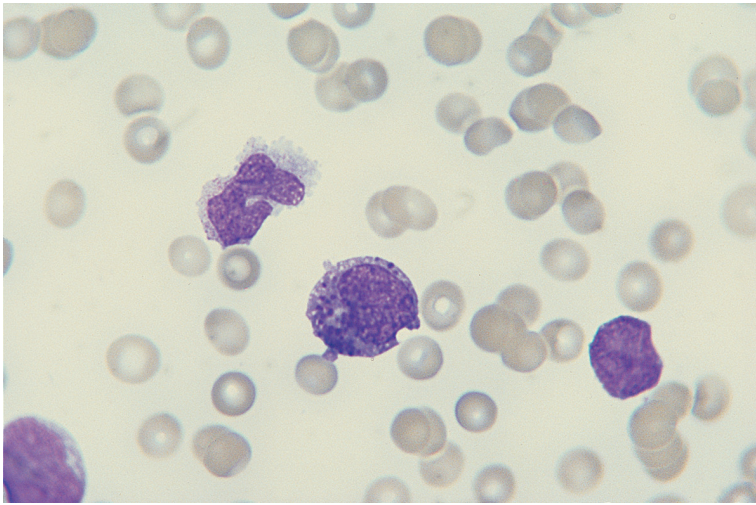


FIGURA 9.21 Distensão sanguínea em leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia (também designada M4 Eo), mostrando um mieloblasto, um monócito e um mielócito eosinófilo com alguns grânulos basófilos. Cortesia do falecido Dr. David Swirsky.

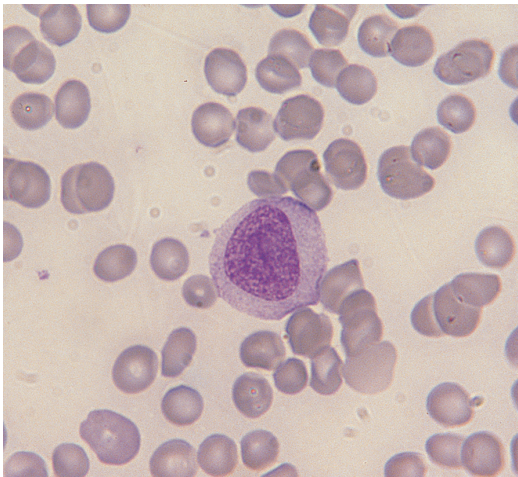


FIGURA 9.22 Distensão sanguínea em leucemia monoblástica aguda (FAB tipo M5a), mostrando um monoblasto com núcleo não lobulado e um nucléolo vesicular. Em geral, os monoblastos são fortemente positivos para esterases não específicas, como a α -naftil acetato esterase (ANAE), podendo apresentar alguns grânulos positivos para MPO e SBB.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da LMA é feito principalmente com a LLA, com a transformação blástica de LMC e de outras neoplasias mieloproliferativas, com as SMDs e com outras causas de insuficiência da medula óssea, como anemia aplástica. Ocasionalmente, é preciso distinguir entre leucemia aguda e reação leucemoide (ver anteriormente).

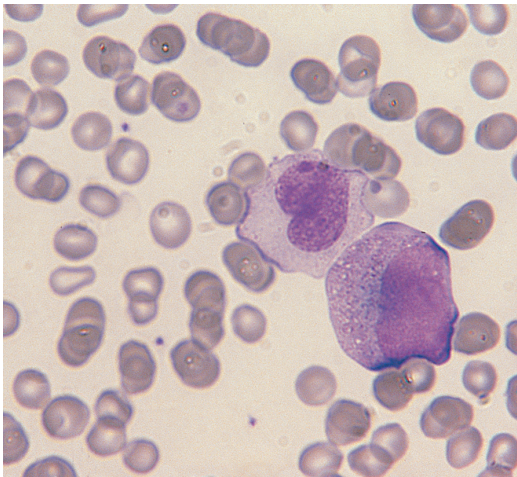


FIGURA 9.23 Distensão sanguínea em leucemia monocítica aguda (FAB tipo M5b), mostrando um promonócito e um monócito; o promonócito apresenta citoplasma moderadamente basófilo, granuloso e vacuolizado; os promonócitos são positivos com SBB, e para MPO e esterases não específicas.

Exames adicionais

Quando houver suspeita de LMA, é indicada uma aspiração de medula óssea para exame citológico (mielograma) e para análise citogenética. A microscopia é seguida de imunofenotipagem a menos que mostre evidências claras da diferenciação mieloide, para distinguir LMA com mínimos sinais de diferenciação e leucemia megacarioblástica aguda de

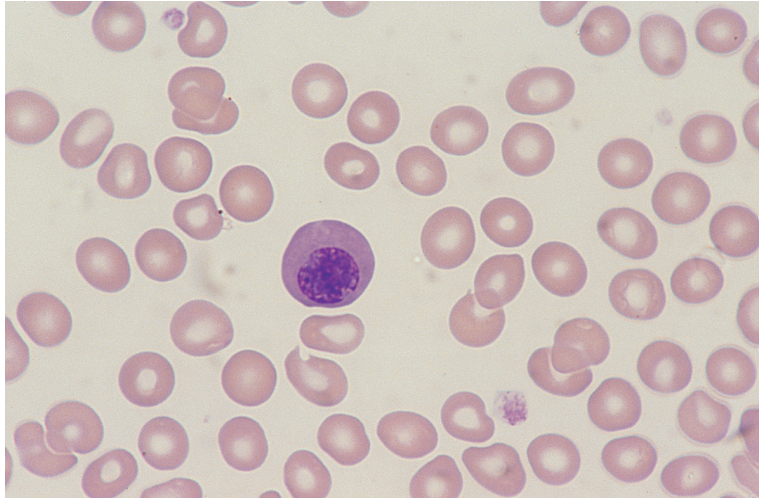


FIGURA 9.24 Distensão sanguínea em eritroleucemia aguda (FAB tipo M6), mostrando um eritroblasto megaloblástico circulante.

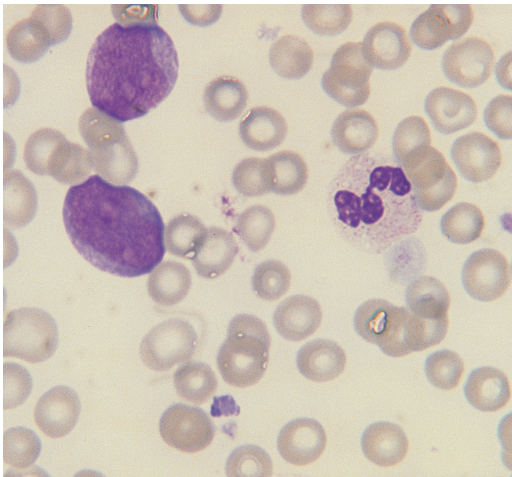


FIGURA 9.25 Distensão sanguínea em leucemia megacarioblástica aguda (FAB tipo M7), mostrando um neutrófilo e duas células blásticas; os blastos não apresentam aspectos citológicos que permitam identificação como megacarioblastos, mas expressaram antígeno associado às plaquetas na imunofenotipagem; a plaqueta hipogranular gigante, adjacente ao neutrófilo, é a única indicação de que essa leucemia pode pertencer a uma linhagem megacariocítica.

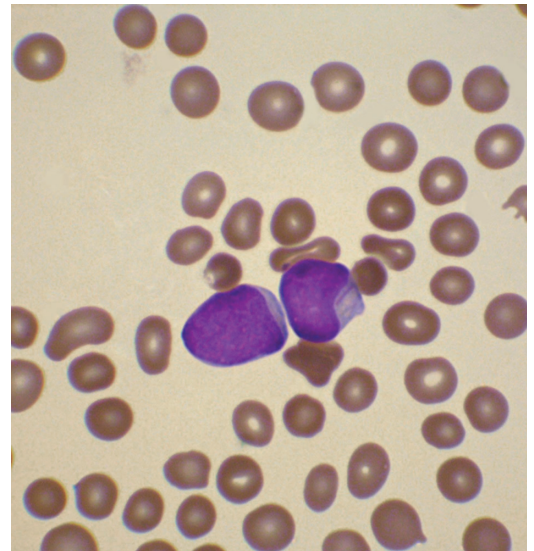


FIGURA 9.26 Distensão sanguínea de paciente com leucemia da categoria da Organização Mundial da Saúde (OMS), LMA com $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1*, mostrando dois blastos, um deles com um longo bastão de Auer na concavidade do núcleo.

LLA; a imunofenotipagem também é essencial para o diagnóstico de leucemias agudas de fenótipo misto. Em serviços que disponham de recursos, deve ser feita imunofenotipagem em todos os casos, para dispor dos resultados, quando necessários, no *follow up* para evidenciar doença residual mínima. Técnicas de citoquímica para confirmar diferenciação granulocítica ou monocítica são muito menos

usadas atualmente, pois isso é feito pela imunofenotipagem; persistem úteis em locais onde a imunofenotipagem não seja obtida com facilidade. As reações citoquímicas mais úteis são a mieloperoxidase (MPO) ou o Sudan black B (SBB) para confirmar diferenciação granulocítica, e uma reação “inespecífica” de esterase, como a α -naftil acetato esterase (ANAE), para confirmar diferenciação monocítica.

Uma reação cloroacetato esterase (CAE) positiva confirma a diferenciação neutrofílica, podendo ser combinada com a ANAE (esterase combinada) para a fácil identificação da leucemia mielomonocítica aguda (FAB tipo M4). Biópsia da medula com tre fina só é necessária em alguns pacientes com medula hipocelular ou se for obtido material escasso à aspiração pela presença de fibrose. Análise genética molecular seletiva para detectar anormalidades genéticas de bom prognóstico (mutação bialélica *CEBPA* e *NPM1* mutado na ausência de mutação

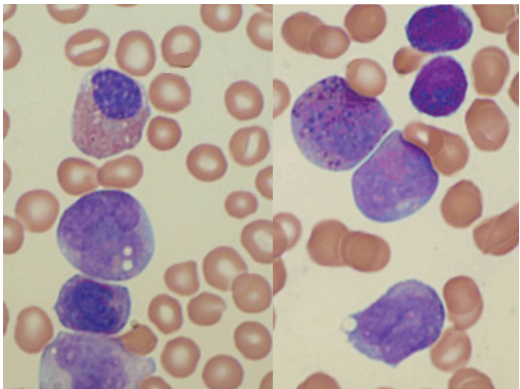


FIGURA 9.27 Imagem composta de distensão sanguínea de paciente com leucemia da categoria da OMS, LMA com inv(16)(p13.1q22); *CBFB-MYH11*. Notar a diferenciação monocítica, um eosinófilo hipobululado e um precursor eosinófilo com grânulos purpúreos proeosinofílicos (ver também Figura 9.21).

FLT3) e para detectar anormalidades genéticas de mau prognóstico que devam ser consideradas no planejamento do tratamento, como a fusão *BCR-ABL1*. Se a análise citogenética não demonstrar, há necessidade de fluorescência com hibridização *in situ* (FISH) ou análise molecular para detectar *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RARA* e *MYH11-CBFB*. O diagnóstico acurado de leucemia promielocítica sempre deve ser considerado urgente, pela necessidade de início imediato do tratamento específico com ácido all-*trans*-retinoico. Isso é geralmente possível apenas em base citológica, mas, na dúvida, tornam-se necessárias (FISH) ou análise da distribuição da proteína PML dentro do núcleo [84].

Leucemia basofílica aguda

É um tipo raro de LMA, reconhecido como uma categoria específica *BCR-ABL1* negativa na classificação da OMS.

Hemograma

O hemograma pode mostrar blastos e basófilos maduros ou somente blastos. Alguns casos podem ser reconhecidos apenas pela citologia, pela presença de grânulos basófilos característicos (ver Figura 9.34); outros exigem exame ultraestrutural.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui outros tipos de LMA com blastos com grânulos grandes basófilos, especialmente leucemia mastocítica, algumas vezes

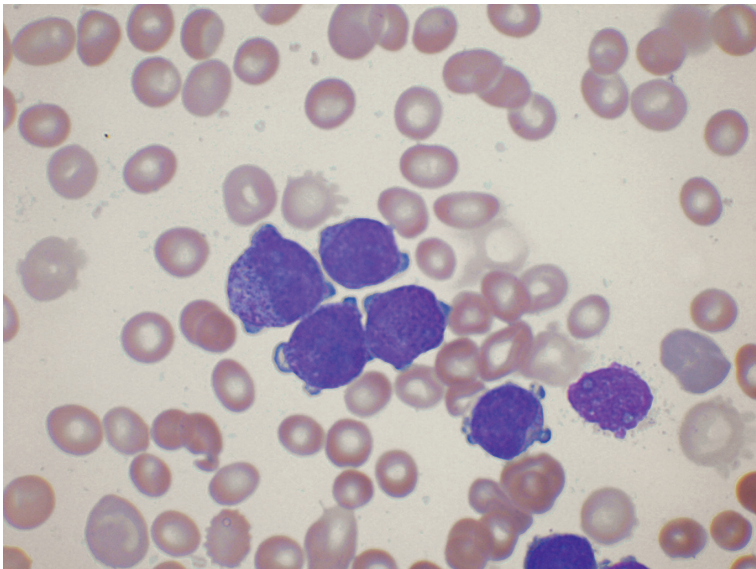


FIGURA 9.28 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA com t(15;17)(q22;q21); *PML-RARA*, que é equivalente à categoria FAB M3 (ver também Figuras 9.18 e 9.19). O caso ilustrado mostra a variante hiperbasófila de leucemia promielocítica aguda. A basofilia intensa do citoplasma e as protruções citoplasmáticas (*blebs*) podem sugerir leucemia megacarioblástica aguda, mas note-se que há uma célula hipergranular (promielócito leucêmico).

FIGURA 9.29 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA com $t(9;11)(p22;q23)$; *MLLT3-MLL* (*MLLT3-KMT2A*); mostrando cinco monoblastos e um promonócito (equivalente à categoria FAB M5a).

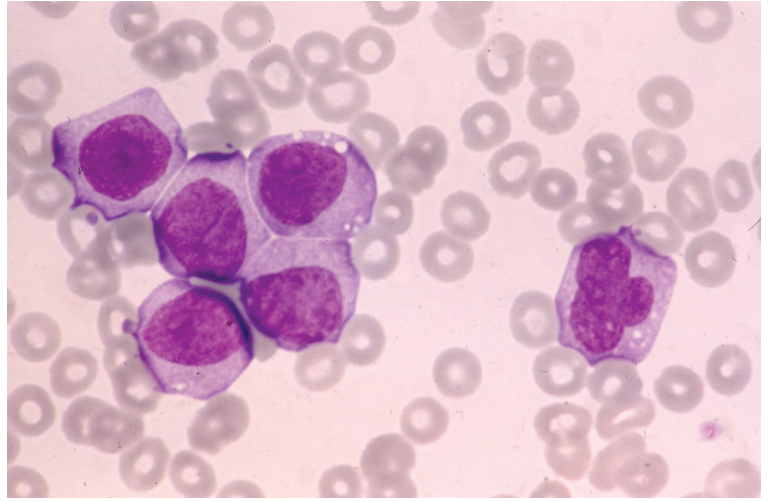


FIGURA 9.30 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA (megacarioblástica) com $t(1;22)(p13;q13)$; *RBM15-MKLL1*, mostrando um megacarioblasto; *blebs* citoplasmáticos como os desta célula são muitas vezes vistos na leucemia megacarioblástica aguda (equivalente à categoria FAB M7).

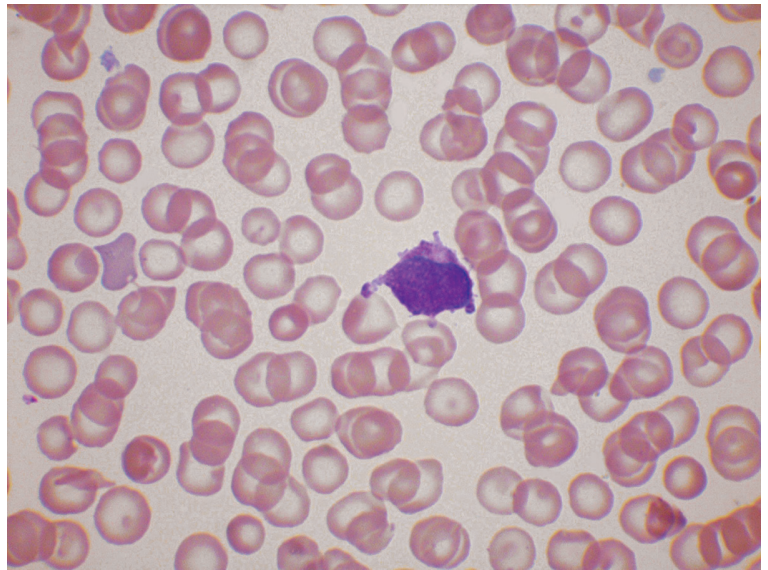
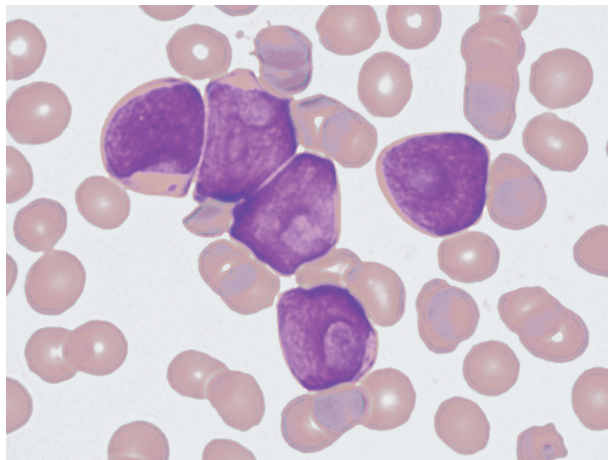


FIGURA 9.31 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA com *NPM1* mutado, mostrando blastos em formato de xícara sem alça. Cortesia do Dr. Mike Leach, Glasgow.



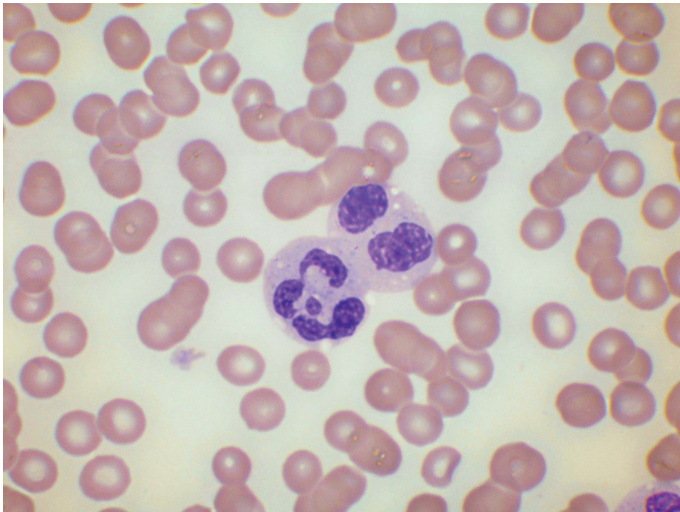


FIGURA 9.32 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA com alterações mielodisplásicas. Há dois neutrófilos displásicos, ambos macropolícitos, um com apenas um núcleo, o outro com dois núcleos pelgeroides. Este caso classificou-se nessa categoria tanto por ter evoluído de uma síndrome mielodisplásica (SMD) prévia, quanto por haver alterações mielodisplásicas em mais de 50% das células da linhagem granulocítica.

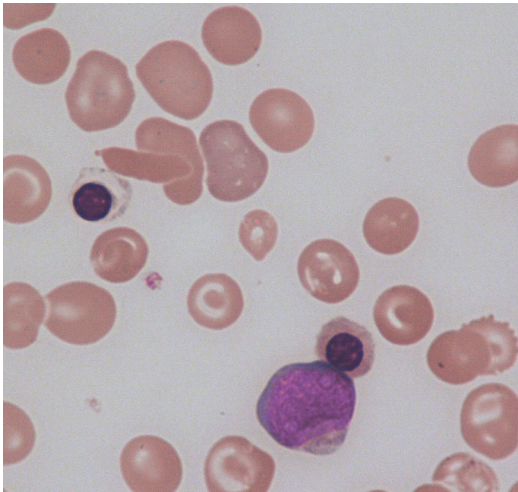


FIGURA 9.33 Distensão sanguínea de paciente com anemia de células falciformes que desenvolveu leucemia da categoria da OMS, LMA com alterações mielodisplásicas. Além de eritrócitos em alvo e uma célula em barco, pela anemia de células falciformes, há dois eritroblastos e um mieloblasto leucêmico. Um dos eritroblastos tem hemoglobinição defeituosa, e estavam presentes micrócitos hipocrômicos. A coloração para ferro (Perls) confirmou a presença de sideroblastos em anel.

leucemia promielocítica hipergranular aguda; os grânulos, nesta última, geralmente são de cor purpúrea-avermelhada, em vez de purpúrea-escura.

Exames adicionais

A maioria dos casos é negativa MPO e SBB e não há bastões de Auer [86]. CD13 e CD33 são positivos

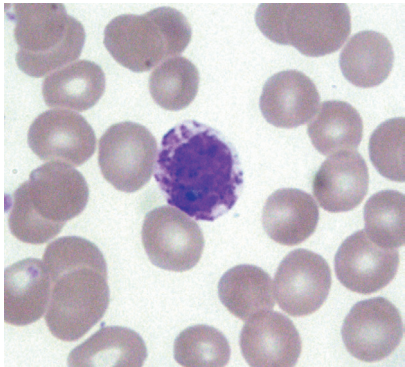


FIGURA 9.34 Distensão sanguínea de paciente com leucemia da categoria da OMS, LMA fora das especificações, leucemia basofílica aguda. Cortesia do Sr. Robin Wells, Brisbane.

e marcadores de basófilos, CD9 e CD25 podem ser positivos [86].

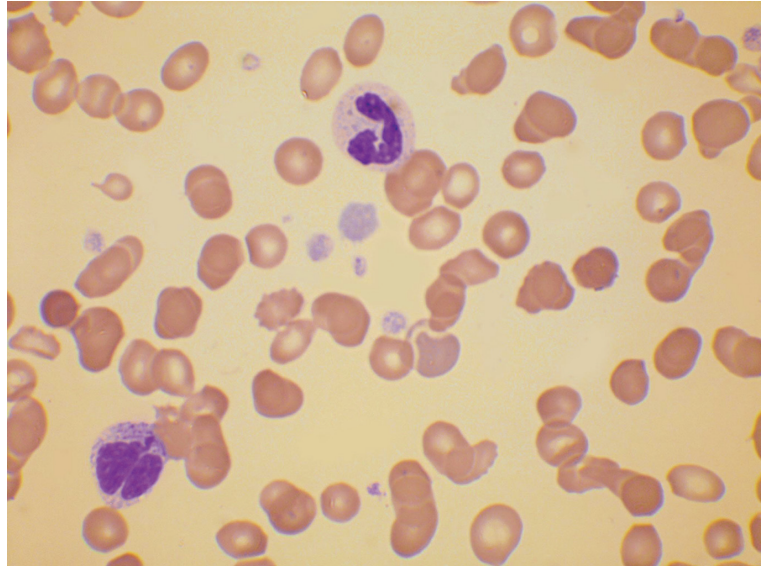
Leucemia mastocítica

Leucemia mastocítica é uma doença rara que pode ocorrer *de novo* ou como complicação de mastocitose sistêmica. Na classificação de 2008 da OMS, está incluída com as demais neoplasias da linhagem mastocítica [79]. Uma leucemia mastocítica ou leucemia mista mastocítica/basofílica pode surgir como fase terminal de LMC [87].

Hemograma

Mastócitos normais têm um núcleo oval pequeno, o qual não é oculto pelos grânulos purpúreos que enchem o citoplasma (ver Figura 3.154). Na leucemia

FIGURA 9.35 Distensão sanguínea de paciente com leucemia da categoria da OMS, LMA fora das especificações, pan-mielose aguda com mielofibrose, mostrando plaquetas grandes e hipogranulares e um granulócito displásico de linhagem incerta. Os aspectos do sangue periférico dessa categoria de LMA são inespecíficos; o diagnóstico é feito pelos achados de aspiração e biópsia da medula óssea.



mastocítica (Figura 9.38), algumas células neoplásicas podem ser semelhantes aos mastócitos normais, mas outras têm núcleos maiores, bilobados ou multilobados. Os grânulos variam da cor vermelha à púrpura-escura, podendo ou não esconder o núcleo; também podem fundir-se em massas homogêneas. Células menos maduras podem apresentar poucos grânulos e núcleo oval ou reniforme, com nucléolos [88, 89].

Diagnóstico diferencial

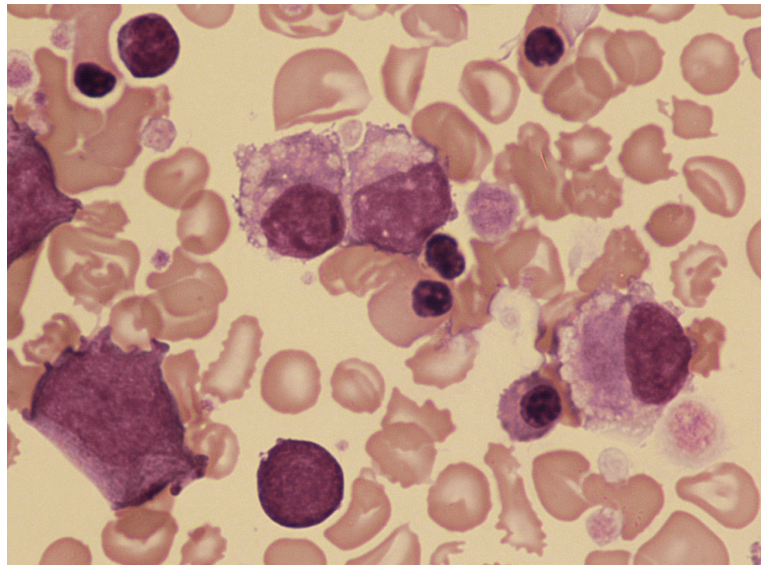
O diagnóstico diferencial é feito com outras leucemias de células neoplásicas hipergranulares,

especificamente leucemia promielocítica hipergranular (LMA M3) e leucemia basofílica. A presença de múltiplos bastões de Auer sugere um diagnóstico de leucemia promielocítica hipergranular aguda.

Exames adicionais

A aspiração da medula óssea e a citoquímica são úteis (Tabela 9.6) para confirmar o diagnóstico. Mastócitos são negativos para MPO e positivos para CAE [86]. CD13, CD33, CD68 e CD117 costumam ser fortemente positivos e há expressão de triptase mastocítica [86]. Mastócitos também podem ser distinguidos

FIGURA 9.36 Distensão sanguínea de caso da categoria da OMS, mielopoese anormal transitória da síndrome de Down. Há três micromegacariócitos, um promielócito, alguns eritroblastos e várias plaquetas gigantes.



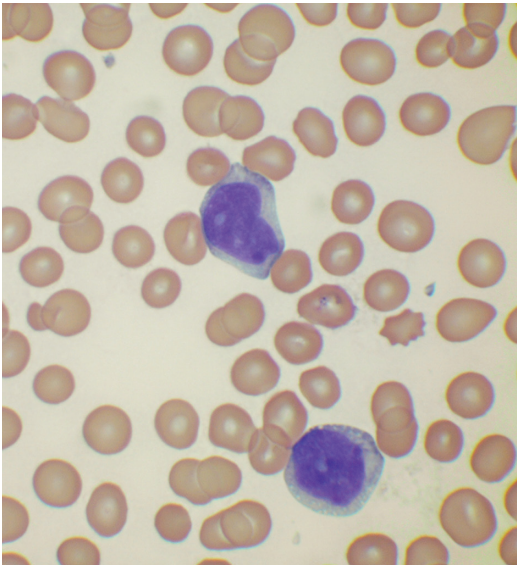


FIGURA 9.37 Distensão sanguínea de leucemia da categoria da OMS, LMA, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, mostrando duas células neoplásicas, uma com vacúolos citoplasmáticos. As células da medula [ossea deste paciente mostravam caudas citoplasmáticas características.

dos basófilos por microscopia eletrônica, a qual mostra os basófilos com grânulos de consistência uniforme ou finamente particulada, enquanto os grânulos dos mastócitos são heterogêneos e contêm estruturas enroladas, lameladas e cristalinas. A dosagem de triptase sérica costuma estar elevada, mas também pode elevar-se em outros tipos de LMA.

Mielopose anormal transitória da síndrome de Down

A mielopose anormal transitória da síndrome de Down ocorre durante a vida intrauterina e em

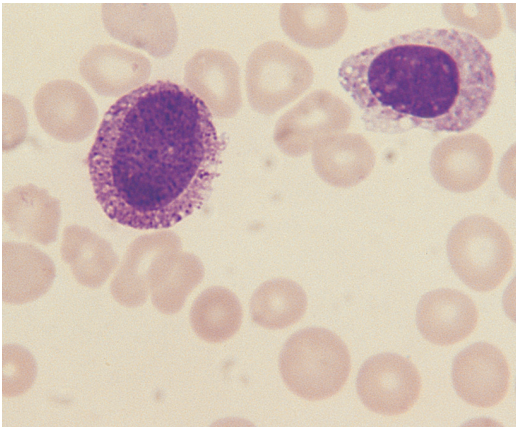


FIGURA 9.38 Distensão de sangue periférico de paciente com leucemia mastocítica aguda, mostrando dois mastócitos. Cortesia da Srta. Desley Scott e do Dr. Ian Bunce, Brisbane.

recém-nascidos. Evidências citogenéticas e moleculares sugerem que esse distúrbio é realmente uma LMA, com frequência com diferenciação megacarioblástica proeminente [91, 92]. Remissão espontânea ocorre em poucas semanas, mas uma porcentagem significativa de bebês afetados desenvolve LMA entre 1 e 2 anos de idade. É reconhecida como uma entidade específica na classificação da OMS.

Hemograma

A distensão de sangue não distingue a síndrome da LMA, mas é comum a presença de megacarioblastos, megacariócitos, micromegacariócitos, plaquetas gigantes ou hipogranuladas e precursores eritroides imaturos (Figura 9.36). A contagem de leucócitos pode estar de moderada a acentuadamente elevada, com alta porcentagem de blastos. Pode haver anemia e trombocitopenia.

TABELA 9.6 Alguns testes citoquímicos utilizados para diferenciar basófilos, mastócitos e promielócitos hipergranulares

Tipo de célula	Basofiloblasto	Basófilo	Mastócito	Promielócito hipergranular
Mieloperoxidase	–	– ou +*	–	+++
Sudan Black B	–	– ou +	– ou +	+++
Cloroacetato esterase	–	–†	+++	+++
Azul-de-toluidina (coloração metacromática)	– ou +	+++	+++	–
Marcadores imunofenotípicos usuais	CD123, CD203c, CD11b, geralmente CD9, CD25 variável, CD117–		CD25, CD68, CD117, triptase mastocítica	Mieloperoxidase, CD117 variável

–, negativo; +, fracamente positivo; +++, fortemente positivo.
*Positivo em promielócitos basófilos a metamielócitos.
† Positivo em promielócitos basófilos a metamielócitos, podendo ser positivo em basófilos leucêmicos [90].

Diagnóstico diferencial

Deve-se fazer o diagnóstico diferencial com leucemia congênita de outros tipos.

Exames adicionais

A análise citogenética é indicada para confirmar a síndrome de Down, pela demonstração da trissomia 21 constitucional, e para excluir anormalidades citogenéticas que possam estar associadas a outros casos de leucemia congênita, como t(4;11)(q21;q23). É indicada análise genética molecular, pois uma mutação no gene *GATA1* está uniformemente presente [92]. Afora a análise molecular, não há investigações laboratoriais que permitam distinguir a mielopoese anormal transitória de outras formas de LMA. Na falta de análise molecular, a diferenciação será feita pela cuidadosa observação das características à morfologia microscópica e pela observação da evolução clínica.

Leucemia mieloide aguda da síndrome de Down

A classificação da OMS reconhece a LMA associada à síndrome de Down como mais uma entidade específica. Desenvolve-se principalmente nos 3 primeiros anos de vida; a criança pode ter apresentado mielopoese anormal transitória no período neonatal e pode, também, apresentar uma fase mielodisplásica prévia à leucemia aguda. Diferenciação megacarioblástica é comum, mas não é constante.

Hemograma

A distensão sanguínea não mostra características distintivas desse tipo específico de LMA, mas aspectos citológicos de diferenciação megacarioblástica são comuns.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com os demais tipos de LMA.

Exames adicionais

Análise citogenética pode mostrar apenas a trissomia 21, ou evidenciar também outras anormalidades não balanceadas adquiridas, como trissomia 8. Análise molecular mostra uma mutação *GATA1*; quando podem ser examinadas amostras pareadas, nota-se que se trata da mesma mutação vista por ocasião da mielopoese anormal transitória prévia.

Síndromes mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) constituem um grupo morfológicamente heterogêneo

de condições decorrentes da proliferação de um clone de células hematopoéticas neoplásicas com anormalidades de proliferação e maturação menos profundas dos que as da LMA. A hematopoese é funcionalmente ineficaz e morfológicamente displásica. As SMDs são potencialmente pré-leucêmicas, embora alguns pacientes morram por complicações da citopenia, sem evoluir para LMA. As SMDs surgem *de novo* ou após exposição a agentes mutagênicos, como radiação ionizante, benzeno e drogas antilêucêmicas, incluindo as alquilantes. A classificação FAB foi suplantada pela classificação da OMS. Esta é hierárquica com os casos, se apropriado, primeiramente incluídos na categoria “LMA e SMD relacionadas a terapêutica” (ver Tabela 9.5) e, então, consecutivamente, na categoria “SMD associada a del(5q) isolada”, depois para as demais categorias, como se vê na Tabela 9.7. A LMMC que, na classificação FAB era considerada uma SMD, está agora na classificação da OMS em uma categoria designada neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (ver adiante).

Hemograma

A distensão de sangue periférico geralmente mostra aspectos sugestivos do diagnóstico (Figuras 9.39 a 9.42). A maioria dos pacientes é anêmica, com eritrócitos normocrômicos, normocíticos ou macrocíticos; anisocitose e pecilocitose são usuais. Em pacientes com eritropoese sideroblástica, observa-se uma pequena população de micrócitos hipocrômicos, e há corpos de Pappenheimer; a população eritroide predominante é geralmente macrocítica. Há anisocitose, pecilocitose e pontilhado basófilo. Pode haver leve leucocitose, número normal ou leucopenia. Por definição, a contagem de leucócitos é $< 13 \times 10^3/\mu\text{L}$; se for mais alta, o caso será categorizado como neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa (SMD/NMP). Pode haver monocitose, mas, por definição, $< 1 \times 10^3/\mu\text{L}$. Neutrofilia é incomum e é muito raro haver aumento de eosinófilos ou de basófilos. Podem estar presentes blastos, às vezes com bastões de Auer. Algumas vezes, são vistos promielócitos, mielócitos e eritroblastos. Em geral, os neutrófilos apresentam aspectos displásicos, em particular, hipogranularidade (ver Figura 9.42), anomalia de Pelger-Huët adquirida (ver Figura 3.75) e excessiva aglomeração da cromatina. A detecção de hipogranularidade nos neutrófilos requer uma coloração perfeita das distensões; uma boa maneira de conferir é observar se ao menos algumas plaquetas são azul-pálidas com grânulos de cor lilás. A hipogranularidade dos neutrófilos pode

TABELA 9.7 Classificação da OMS das síndromes mielodisplásicas (SMDs) [93]*

Doença	Achados no sangue periférico	Achados na medula óssea
SMD associada a del(5q) isolada	Anemia, contagem de plaquetas normal ou elevada, blastos < 1%	Megacariócitos em número normal ou aumentado, mas com núcleos hipolobulados, blastos < 5%, sem bastões de Auer, 5q– como única anormalidade citogenética
Citopenia refratária com displasia de uma linhagem (RCUD) – principalmente anemia refratária, mas também trombocitopenia refratária e neutropenia refratária	Citopenia afetando uma ou duas linhagens, blastos raramente vistos e sempre < 1%, monócitos < 1 × 10 ³ /μL	Displasia confinada uma linhagem, blastos < 5%, sideroblastos em anel < 15%
Anemia refratária com sideroblastos em anel (RARS)	Anemia, sem blastos, monócitos < 1 × 10 ³ /μL	Displasia confinada à linhagem eritroide, blastos < 5%, sideroblastos em anel ≥ 15%
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (RCMD)	Bicitopenia ou pancitopenia, blastos < 1%, sem bastões de Auer, monócitos < 1 × 10 ³ /μL	Displasia em ≥ 10% das células de duas ou mais linhagens mieloides, blastos < 5%, sem bastões de Auer, sideroblastos em anel podem estar presentes ou ausentes
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (RAEB-1)	Citopenias, blastos < 5%, sem bastões de Auer, monócitos < 1 × 10 ³ /μL	Displasia de uma ou múltiplas linhagens, blastos 5 a 9%, sem bastões de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (RAEB-2)	Citopenias, blastos 5-19%, [†] bastões de Auer às vezes presentes, [‡] monócitos < 1 × 10 ³ /μL	Displasia de uma ou múltiplas linhagens, blastos 10 a 19%; bastões de Auer às vezes presentes
Síndrome mielodisplásica inclassificável (SMD-U)**	Podem corresponder aos critérios de RCUD, exceto por pancitopenia; [‡] podem corresponder aos critérios de RCUD ou RCMD, exceto por blastos 1% no sangue [‡] (mas não mais de 1%) sem bastões de Auer	Citopenia com displasia < 10% em todas as linhagens uma linhagem, mas uma anormalidade citogenética definida presente [‡] , blastos < 5%, sem bastões de Auer

*Casos relacionados ao tratamento são classificados com as leucemias mieloides agudas, como neoplasias mieloides (LMA/SMD) relacionadas a terapêutica (ver Tabela 9.5).

**MDS (myelodysplastic syndrome) foi traduzida para SMD – como em todo o livro – mas foi mantido o U de *unclassified*.

[†]Para um caso ser categorizado como RAEB-2, deve haver OU blastos ≥ 5% no sangue OU blastos ≥ 10% na medula óssea OU bastões de Auer.

[‡]Um desses três critérios deve estar presente.

N. de T. As siglas RCUD, RARS, RCMD, RAEB, foram mantidas como no original em inglês porque são internacionalmente usadas;

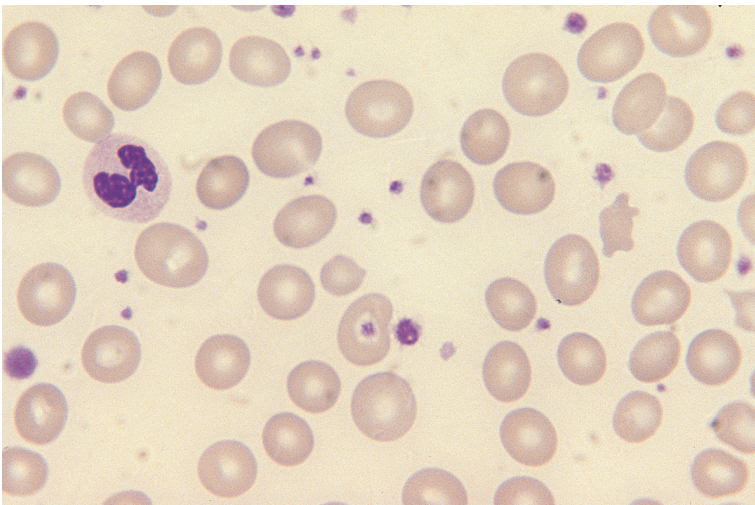


FIGURA 9.39 Distensão sanguínea de paciente com SMD – anemia refratária (classificação FAB), citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (classificação da OMS) –, mostrando anisocitose, macrocitose e um pecilócito; o neutrófilo é hipogranular.

FIGURA 9.40 Distensão sanguínea de paciente com SMD – anemia refratária com sideroblastos em anel (classificações FAB e OMS), mostrando uma célula em alvo (*target cell*) e vários micrócitos hipocrômicos; os demais eritrócitos são normocrômicos e normocíticos ou macrocíticos; o VCM era 103 fL.

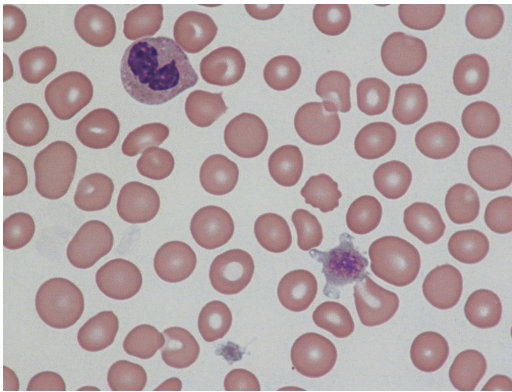
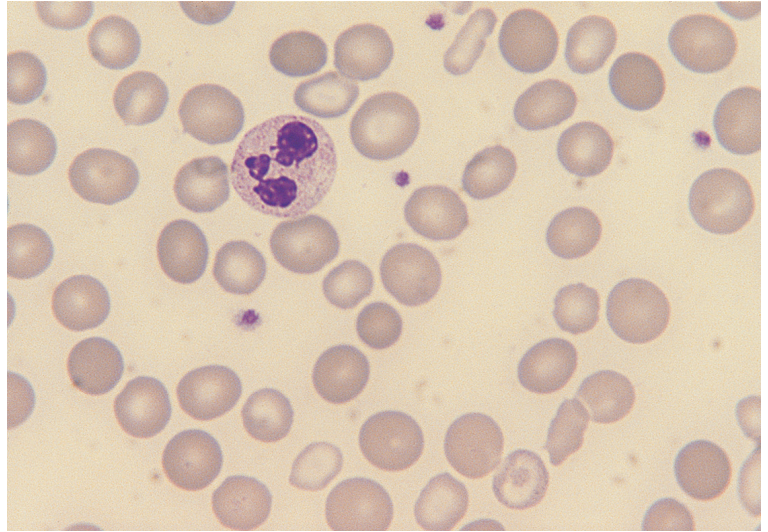


FIGURA 9.41 Distensão sanguínea de paciente com SMD – anemia refratária (classificação FAB), citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (classificação da OMS) –, mostrando macrocitose e evidência de displasia nas linhagens granulocítica e megacariocítica. Há um neutrófilo hipolobulado, uma plaqueta gigante e uma acen tuadamente hipogranular.

ser notada de maneira reprodutível entre observadores se o critério adotado for redução de ao menos dois terços dos grânulos [94]. Frequentemente, há trombocitopenia; em uma minoria de pacientes, há trombocitose; por definição, a contagem de plaquetas deve ser $< 450 \times 10^3/\mu\text{L}$, senão o caso será classificado como SMD/NMP. As plaquetas podem mostrar aspectos displásicos, como tamanho grande (macroplaquetas ou plaquetas gigantes) e hipogranularidade.

Instrumentos automáticos podem emitir *flags* de blastos, mostrar neutrófilos com características aberrantes, ou mostrar populações eritrocíticas anormais. Com instrumentos da série Siemens Advia, aumento de macrocitos normocrômicos e de macrocitos hipocrômicos, não relacionado à reticulocitose, também fornece evidência de eritropoiese displásica. Esses instrumentos também demonstram um padrão particular de citograma eritroide que se demonstrou preditivo da presença de sideroblastos em anel (ver Figura 8.35).

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é feito com outras causas de anemia macrocítica e de citopenia, com LMA e com condições não neoplásicas que provocam displasia, como infecção por HIV, exposição a metais pesados e efeitos diretos (em vez de efeitos em longo prazo) de quimioterapia antilblástica.

Exames adicionais

A aspiração da medula óssea em geral é necessária ao diagnóstico e é sempre necessária para a classificação (ver Tabela 9.7) e para estabelecer o prognóstico. MPO ou SBB são úteis para identificação segura de bastões de Auer, e a reação de Perls é indispensável para a identificação de sideroblastos em anel. A biópsia com trefina pode ser útil, particularmente se a medula óssea for hipocelular ou se for obtido um material pobre à aspiração pela presença de fibrose. Quando as evidências citológicas forem insuficientes para a confirmação do diagnóstico, pode-se utilizar a

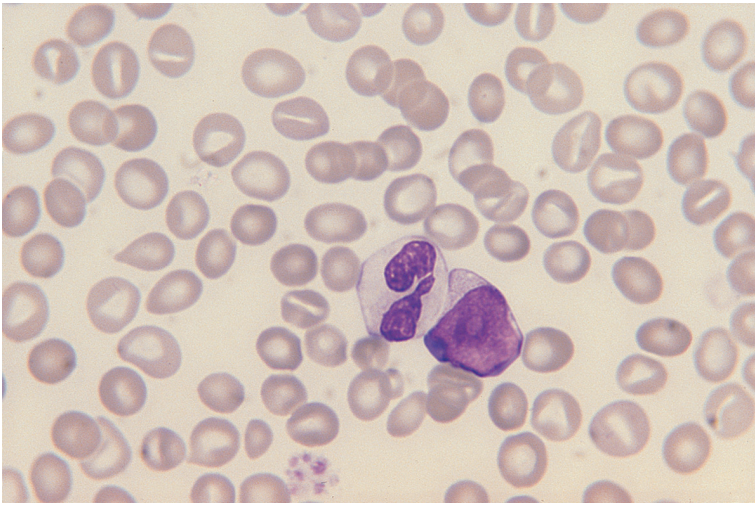


FIGURA 9.42 Distensão sanguínea de paciente com SMD – anemia refratária com excesso de blastos (RAEB, classificações FAB e OMS) –, mostrando um mieloblasto e um neutrófilo hipogranular; os eritrócitos mostram anisocitose e pecilocitose, com dacríócitos e estomatócitos.

análise citogenética ou outras investigações para estabelecer a clonalidade das células hematopoéticas. Análise citogenética também é importante para determinar o prognóstico e para aplicar da classificação da OMS. É igualmente essencial para o reconhecimento de casos associados a del(5q); este dado é clinicamente importante devido à responsividade ao tratamento com lenalidomida.

Neoplasias mieloproliferativas e mielodisplásicas/mieloproliferativas

A classificação da OMS reconhece um grupo de neoplasias mieloproliferativas (NMPs) e outro de SMD/NMP (Tabela 9.8). Diversos tipos de leucemia mieloide crônica estão reunidos nesses dois grupos e, além disso, outros estão classificados separadamente, de acordo com anormalidades genético-moleculares específicas. As leucemias mieloides crônicas diferem das agudas por haver maturação eficaz, com produção de granulócitos maduros.

Neoplasias mieloproliferativas

Policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial foram discutidas no Capítulo 8. Outras NMPs serão discutidas neste Capítulo.

Leucemia mieloide crônica (LMC)

A entidade específica, referida de maneira diversa como leucemia granulocítica crônica, leucemia mielógena crônica e leucemia mieloide crônica, é associada com uma translocação específica, t(9;22)(q34;q11.2), levando à formação de um cromossomo 22 anormal, dito cromossomo Filadélfia (Ph),

TABELA 9.8 Classificação de 2008 da OMS das neoplasias mieloproliferativas e mielodisplásicas/mieloproliferativas [76]

Neoplasias mieloproliferativas
Leucemia mieloide crônica, <i>BCR-ABL1</i> positiva
Leucemia neutrofílica crônica
Leucemia eosinofílica crônica, sem outras especificações*
Mielofibrose primária
Policitemia vera
Trombocitemia essencial
Mastocitose
Neoplasias mieloproliferativas, inclassificáveis
Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas
Leucemia mielomonocítica crônica
Leucemia mieloide crônica atípica
Leucemia mielomonocítica infantil
Outras neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, inclassificáveis

*Casos com rearranjo de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1* estão excluídos.

e um gene de fusão específico, *BCR-ABL1*. A designação “leucemia mieloide crônica” é amplamente usada* para esta entidade específica, mas o termo não é ideal por ser também usado como termo genérico para um grupo mais amplo de distúrbios. A LMC ocorre em todas as idades, mas a incidência aumenta significativamente com a idade. Caracteriza-se clinicamente por anemia, esplenomegalia e hepatomegalia.

*N. de T. É a denominação mais usada no Brasil.

Hemograma

A contagem de leucócitos está elevada, muitas vezes de forma considerável. A contagem diferencial (Figura 9.43) [95] e a distensão sanguínea (Figura 9.44) são praticamente patognômicas, com neutrófilos como célula predominante e mielócitos em segundo lugar. Em pacientes com contagem muito elevada, as células blásticas podem chegar a 15%, mas, ainda sim, representam menor porcentagem do que os promielócitos, que, por sua vez, são menos frequentes que os mielócitos. Em quase todos os casos, há aumento da contagem absoluta de basófilos e, em mais de 90% dos casos, da contagem absoluta de eosinófilos. Alguns eosinófilos podem apresentar uma parte dos grânulos com coloração basófila. Monócitos estão aumentados, mas não na proporção dos neutrófilos. Podem ser vistos alguns eritroblastos. Aspectos displásicos são insignificantes. Em geral, a contagem de plaquetas é normal ou aumentada; em uma minoria de casos, está reduzida. Há aumento do tamanho das plaquetas. Algumas vezes, observam-se megacariócitos circulantes, quase sempre núcleos nus. Uma minoria de pacientes apresenta-se com trombocitose isolada.

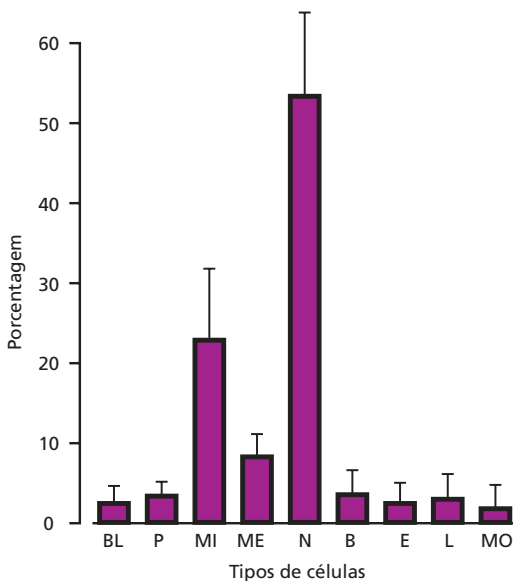


FIGURA 9.43 Representação diagramática da contagem diferencial típica de leucemia mieloide crônica (LMC), com base na contagem diferencial de 1.500 células em 50 pacientes com LMC Filadélfia-positiva [85]. BL, blastos; P, promielócitos; MI, mielócitos; ME, metamielócitos; N, neutrófilos; B, basófilos; E, eosinófilos; L, linfócitos; MO, monócitos.

Alguns pacientes com LMC apresentam acentuadas alterações cíclicas da contagem de leucócitos, com a periodicidade de 50-70 dias, variando os níveis de francamente leucêmicos a quase normais. Todas as células mieloides participam dos ciclos.

Uma minoria de pacientes tem fibrose da medula óssea à apresentação, com os aspectos do sangue periférico típicos de mielofibrose sobrepondo-se aos aspectos de LMC.

A maioria dos pacientes com LMC, ao diagnóstico, já apresenta sintomas e está com a doença claramente estabelecida. Um número crescente, entretanto, está sendo diagnosticado por hemograma feito por motivo fortuito, em estado ainda assintomático. Alguns pacientes que desenvolveram a doença enquanto estavam sendo monitorizados hematologicamente por outras causas permitiram definir os primeiros estágios da doença. Os primeiros aspectos detectáveis no sangue periférico são aumento da contagem de basófilos, trombocitose e baixo escore de LAP. Depois, elevam-se as contagens de neutrófilos e de leucócitos, aparecendo um pequeno número de células imaturas. Com a elevação progressiva da contagem de leucócitos que se segue, há um aumento progressivo e constante da porcentagem de células imaturas.

A história natural da LMC prevê que a doença termine em transformação em leucemia aguda, também chamada crise blástica (ver adiante), frequentemente precedida por uma fase acelerada. Mielofibrose secundária também pode surgir. Com o advento do tratamento eficaz com inibidores da tirosinaquinase, que leva à duradoura remissão na maioria dos pacientes, essa evolução é vista com menor frequência.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser feito com neutrofilias reacionais, com as demais leucemias mieloides e com os estágios iniciais da policitemia vera e da trombocitemia essencial. Aspectos utilizados para distinguir LMC de neutrofilia reacional foram apresentados na Tabela 9.3, mas, na prática, só há dificuldade diagnóstica em casos iniciais de LMC.

Exames adicionais

Para confirmar o diagnóstico são indicadas análises citogenética e molecular. Na grande maioria dos casos, a LMC está associada a $t(9;22)(q34;q11)$. Em uma minoria de casos, clínica e hematologicamente indistinguíveis, falta a translocação cromossômica detectável à microscopia, mas ainda está presente o

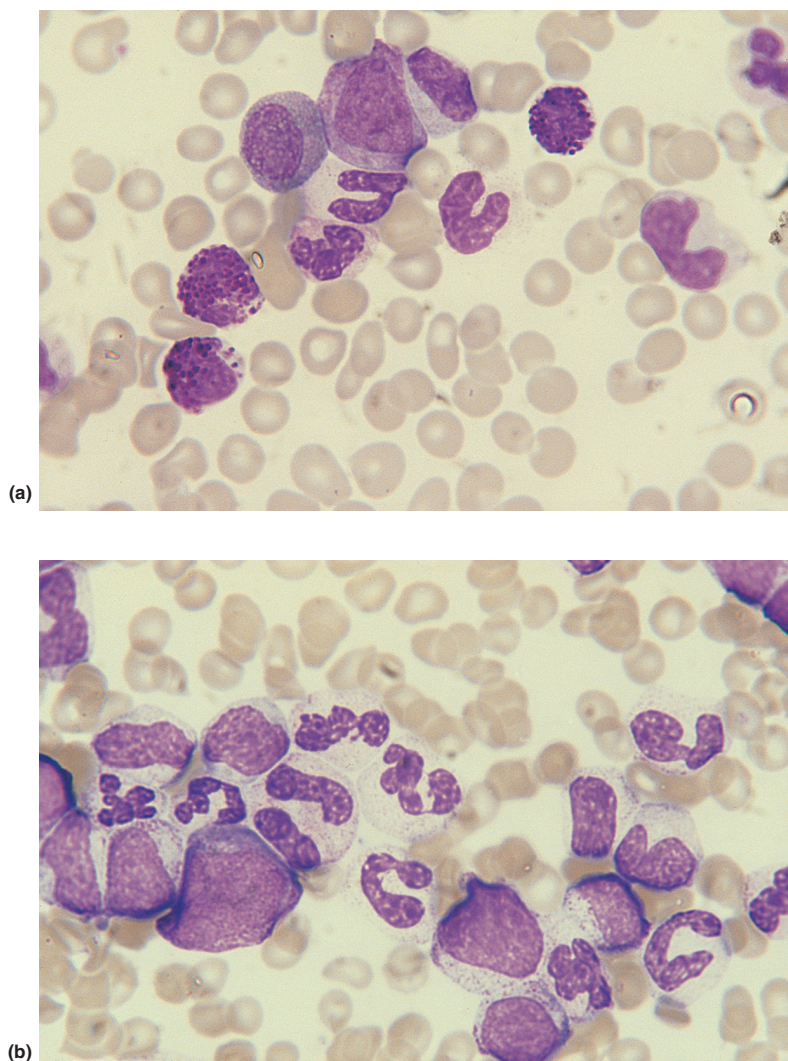


FIGURA 9.44 Distensão sanguínea em LMC Filadélfia-positiva, mostrando: (a) um promielócito, um mielócito eosinófilo, três basófilos e alguns neutrófilos segmentados e bastonados; e (b) um promielócito, vários mielócitos, neutrófilos bastonados e segmentados; é relativamente rara a presença de um neutrófilo binucleado.

gene de fusão *BCR-ABL1*. Análise molecular é sempre indicada, pois a identificação do *breakpoint* específico facilitará a monitoração futura de doença residual mínima. A análise FISH com sondas *BCR* e *ABL1* também é uma técnica útil, particularmente durante o acompanhamento dos casos.

Em mais de 90% dos casos de LMC na fase crônica, o escore de LAP está reduzido, mas este já não é mais considerado um teste útil.

Leucemia mieloide crônica em fase acelerada e em transformação aguda

A fase crônica que dura meses ou anos pode ser seguida por uma transformação blástica, precedida ou

não por uma fase acelerada. Aspectos clínicos dessa evolução incluem palidez, suscetibilidade a equimoses, aumento da hepatoesplenomegalia, raramente linfonodomegalias e tumores em tecidos moles, dor óssea e, sempre, refratariedade ao tratamento.

Hemograma

Durante a fase acelerada, pode haver anemia, leucocitose, trombocitopenia, trombocitose, aumento progressivo da contagem de basófilos e de blastos e aparecimento de aspectos displásicos (Tabela 9.9 e Figura 9.45). A transformação blástica pode ocorrer sem sinais prévios ou ser precedida por uma fase acelerada. A nova população leucêmica é linfoblástica

TABELA 9.9 Algumas anormalidades hematológicas que podem ser detectadas durante a fase acelerada da leucemia mieloide crônica

Eritrócitos e precursores Anemia (incluindo a decorrente de aplasia eritroide, caracterizada por extrema reticulocitopenia), macrocitose, pecilocitose acentuada (que pode ser consequente da fibrose da medula óssea), eritroblastos vacuolizados (PAS-positivos), hipocromia e microcitose
Leucócitos e precursores Leucocitose refratária, aumento da contagem de basófilos, desaparecimento da eosinofilia, aumento da monocitose, anomalia de Pelger-Huët adquirida dos neutrófilos ou eosinófilos, neutrófilos hipogranulares, neutrófilos vacuolizados, anomalia pseudo-Chédiak-Higashi (grânulos gigantes) dos neutrófilos e precursores, binuclearidade e outros aspectos displásicos dos precursores dos neutrófilos, aumento da porcentagem de células blásticas com redução da porcentagem de células mais maduras, bastões de Auer nas células blásticas
Plaquetas e megacariócitos Trombocitopenia, trombocitose, micromegacariócitos, núcleos nus de megacariócitos
Gerais Pancitopenia (pode ser uma consequência de esplenomegalia refratária ou, raramente, de necrose da medula óssea)

PAS, ácido periódico de Schiff.

em um quarto parte dos casos e mieloide ou mista, linfoblástica/mieloide, nos demais (Tabela 9.10). Quando mieloide, muitas vezes é megacarioblástica ou mieloblástica/megacarioblástica. Um paciente que entra em remissão de uma crise blástica (p. ex., linfoblástica) pode, subsequentemente, sofrer uma segunda crise blástica com células de linhagem diferente (p. ex., megacarioblástica).

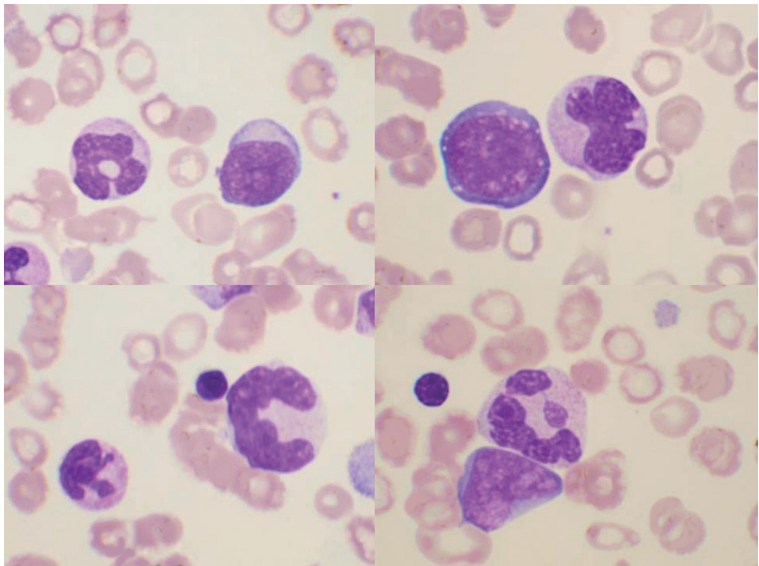
Diagnóstico diferencial

Pacientes podem se apresentar já de início em transformação blástica; nesse caso, o diagnóstico diferencial deve ser feito com as leucemias agudas. Pacientes apresentando-se na fase acelerada

TABELA 9.10 Tipos de transformação que podem ocorrer na leucemia mieloide crônica

Transformação mieloblástica
Transformação linfoblástica
Transformação megacariocítica (com micromegacariócitos e trombocitose)
Transformação megacarioblástica
Transformação eritroblástica [96] e eritropoese sideroblástica adquirida
Transformação monoblástica [97]
Transformação basofiloblástica [98]
Transformação mastocitária e mista basófila/mastocitária [87]
Transformação eosinofiloblástica [99]
Transformação promielocítica hipergranular [100]
Transformações com várias combinações de tipos celulares
Mielofibrose aguda

FIGURA 9.45 Imagem composta de distensão sanguínea de LMC em fase acelerada, associada à evolução citogenética, mostrando aumento de blastos e uma série de aspectos displásicos.



também podem simular leucemia mieloide crônica atípica ou outra neoplasia mieloide. Em pacientes diagnosticados na fase crônica, o diagnóstico é óbvio pelos aspectos clínicos e hematológicos.

Exames adicionais

Aspiração da medula óssea é indicada, salvo se houver grande número de blastos na periferia. A análise citogenética também é indicada, pois alterações citogenéticas evoluem logo antes ou durante a fase acelerada ou a transformação aguda. Imunofenotipagem dos blastos é útil para evidenciar se a transformação é linfoblástica, pois esta é mais responsiva ao tratamento apropriado.

Leucemia neutrofílica crônica

É uma rara condição, caracterizada clinicamente por anemia, esplenomegalia e, às vezes, hepatomegalia.

Hemograma

Há anemia e marcada neutrofilia com poucas células imaturas circulantes (Figura 9.46). A contagem de leucócitos é da ordem de 40 a $70 \times 10^3/\mu\text{L}$. Não há basofilia, eosinofilia ou monocitose. Os neutrófilos podem ter granulações tóxicas ou corpos de Döhle [101]. Neutrófilos com núcleo em anel são comuns [102]. Alguns casos têm evidentes aspectos displásicos [103]; note-se que a classificação da OMS exclui dessa categoria os casos com displasia [104]. A doença pode terminar em transformação aguda.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as neutrofilias reacionais (incluindo reação leucemoide neutrófila associada a

mieloma múltiplo ou gamopatia monoclonal de significação obscura) e com outras leucemias crônicas e neoplasias mieloproliferativas.

Exames adicionais

Aspiração da medula óssea e análise citogenética são indicadas. Deve ser feito proteinograma para excluir neutrofilia associada com gamopatias monoclonais. O escore LAP geralmente é alto. Na falta de alterações citogenéticas clonais, pode haver necessidade de um período de observação para a diferenciação de uma neutrofilia reacional.

Leucemia eosinofílica crônica sem outras especificações

Eosinofilia, às vezes acentuada, pode ser um aspecto da LMA. Também há casos de leucemia nos quais as células leucêmicas são quase todas eosinófilos maduros, ou células maduras e imaturas da linhagem eosinofílica, mas com a medula e o sangue mostrando uma porcentagem de blastos inferior a 20%. Esses casos são referidos como leucemia eosinofílica crônica. O prognóstico é variável, relacionando-se com a porcentagem de blastos na medula e com a extensão do dano tecidual consequente à liberação do conteúdo dos grânulos eosinófilos. A classificação da OMS requer uma contagem de eosinófilos acima de $1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ e que os blastos estejam acima de 2% no sangue ou acima 5% na medula óssea, **ou** que haja evidência citogenética ou molecular de clonalidade [105]. Casos com um rearranjo de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1* são classificados separadamente [106, 107];

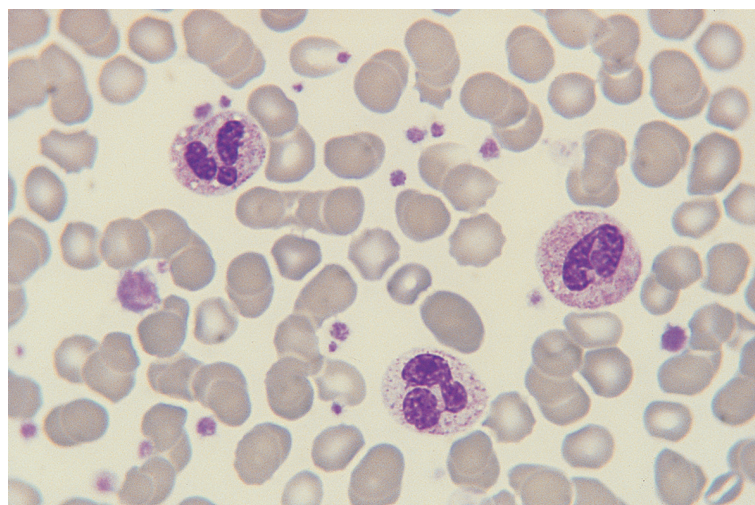


FIGURA 9.46 Distensão sanguínea de leucemia neutrofílica crônica. Os neutrófilos apresentam granulação tóxica e vacuolização. Observa-se uma plaqueta gigante. Outros neutrófilos apresentavam corpos de Döhle e havia macropolicitos.

os demais casos são designados leucemia eosinofílica crônica sem outras especificações [105].

Hemograma

A distensão sanguínea (Figura 9.47) mostra eosinófilos maduros, algumas vezes, também, blastos, promielócitos e mielócitos eosinófilos. Os eosinófilos maduros frequentemente apresentam hipogranularidade, vacuolização e hipolobulação, mas, às vezes, são citologicamente normais. Eosinófilos e mielócitos pré-eosinófilos escuros. Na leucemia eosinofílica aguda, os blastos e, ocasionalmente, células mais maduras, podem conter bastões de Auer, mas estes não são vistos na leucemia eosinofílica crônica. Anemia e trombocitopenia são comuns. Pode haver neutrofilia e neutrófilos com granulações grosseiras; monocitose também pode ocorrer.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com as eosinofilias reacionais (ver anteriormente), com leucemia mieloide crônica atípica ou leucemia mielomonocítica crônica com eosinofilia e com SHE idiopática. Só é diagnosticada SHE idiopática após exclusão, pela investigação apropriada de todas as outras causas de eosinofilia. Dentre as eosinofilias reacionais que podem ser confundidas com leucemia eosinofílica, estão incluídas as que ocasionalmente acompanham a LLA (Figura 9.48) e raros casos de linfoma não Hodgkin.

Exames adicionais

São indicadas aspiração da medula óssea e análises citogenética e molecular, ou análise FISH para *FIP1L1-PDGFR*. No mielograma, deve-se pesquisar especificamente um aumento de blastos, mieloblastos ou linfoblastos, células linfomatosas e mastócitos anormais. Se houver dúvida quanto ao diagnóstico, deve-se fazer também biópsia da medula, que revela melhor os aspectos linfomatosos ou de mastocitose sistêmica. A análise citogenética tem revelado uma variedade de anormalidades cromossômicas clonais, incluindo trissomia 8, del(20q), um isocromossomo de 17q e rearranjos envolvendo o braço longo do cromossomo 5. Em pacientes sem evidência de uma causa de eosinofilia reacional nem evidência morfológica ou citogenética de que a eosinofilia represente leucemia, são úteis a imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico e a análise do receptor de células T para estabelecer clonalidade de células T e explicar a eosinofilia como decorrente desse clone T aberrante. O diagnóstico de leucemia eosinofílica é facilmente estabelecido em casos em que houver aumento significativo de blastos e de outras células imaturas, displasia de outras linhagens, uma anormalidade citogenética clonal ou outra evidência de clonalidade de células mieloides. Também confirma esse diagnóstico a presença de tumores dos tecidos moles, compostos por células granulocíticas imaturas. Em casos com predominância de eosinófilos maduros, pode ser difícil estabelecer o diagnóstico. A presença de anormalidades morfológicas, mesmo acentuadas, limitadas aos eosinófilos, **não** tem utilidade diagnóstica, pois

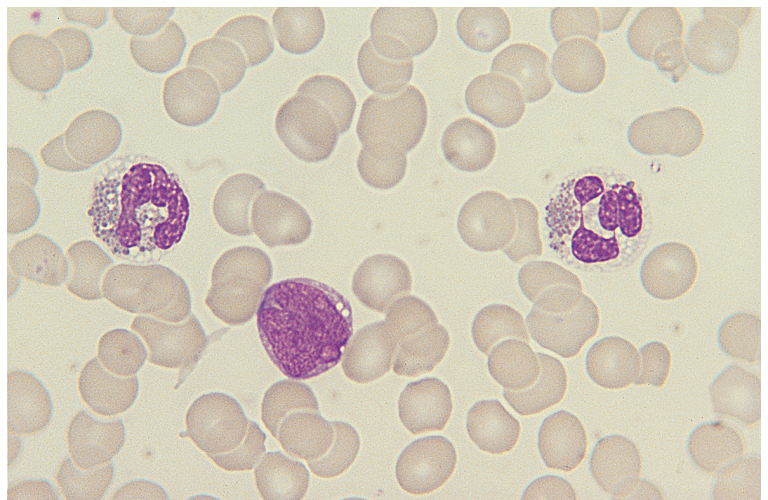


FIGURA 9.47 Distensão de sangue periférico na leucemia eosinofílica, mostrando uma célula blástica e dois eosinófilos vacuolizados e parcialmente desgranulados.

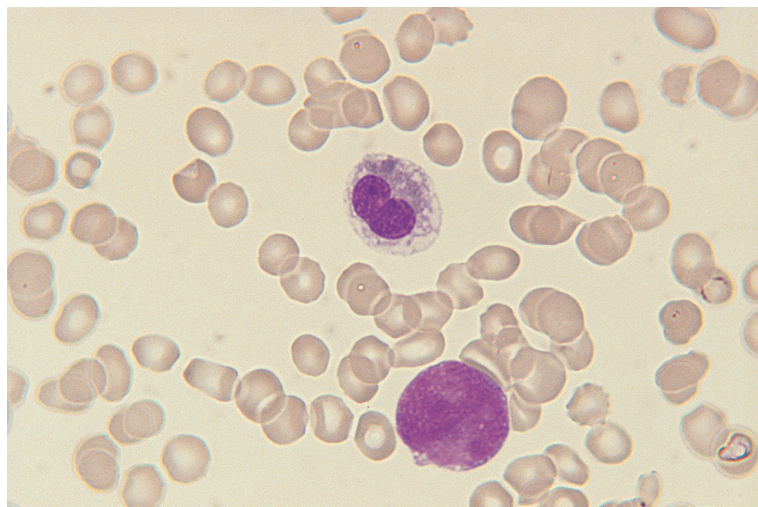


FIGURA 9.48 Distensão sanguínea de paciente com LLA com eosinofilia reacional, mostrando um linfoblasto e um eosinófilo hipolobulado parcialmente desgranulado. Nesses casos, é importante estabelecer a linhagem dos blastos por imunofenotipagem.

elas também podem ser observadas na eosinofilia reacional e na mastocitose sistêmica. Certos casos que inicialmente não podem ser diferenciados da SHE idiopática só terão a natureza leucêmica confirmada pela evolução subsequente da doença.

Casos identificados como *BCR-ABL1* positivos, uma ocorrência rara, devem ser classificados como variantes da LMC e tratados de acordo.

Mastocitose

Como o mastócito é derivado de uma célula mielóide multipotente, justifica-se classificar a mastocitose como uma NMP. A mastocitose costuma ser uma doença indolente, caracterizada por sintomas sistêmicos decorrentes da liberação do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Pacientes com linfonodomegalias e eosinofilia, aspectos mielodisplásicos ou mieloproliferativos acometendo outras séries têm um curso mais agressivo. Uma minoria de pacientes tem urticária pigmentosa pela infiltração cutânea por mastócitos. A doença pode terminar por transformação em LMA, originada em linhagens mielóides diversas da mastocítica.

Hemograma

A distensão sanguínea pode mostrar sinais mieloproliferativos ou displásicos, como eosinofilia, monocitose e trombocitose ou anemia e trombocitopenia. Às vezes, há um pequeno número de mastócitos circulantes, que podem ter citologia anormal (Figura 9.49).

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é amplo, incluindo outras NMPs, neoplasias mielóides com rearranjo de

PDGFRA, *PDGFRB* ou *FGFR1*, e SMD. Leucemia eosinofílica crônica e LMC atípica com eosinofilia, associadas ao gene de fusão *FIP1L1-PDGFRA*, são importantes no diagnóstico diferencial, porque às vezes associam-se à mastocitose na medula óssea e ao aumento da triptase sérica.

Exames adicionais

Aspiração da medula óssea para análise citogenética e molecular e biópsia com trefina são necessárias para o diagnóstico. Análise citogenética pode mostrar uma anormalidade clonal, e análise genética molecular mostra uma mutação *KIT* na maioria dos pacientes. O exame histológico mostra infiltração por mastócitos citologicamente anormais, com expressão aberrante de CD2 e CD25. A triptase sérica mastocítica está aumentada.

Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas

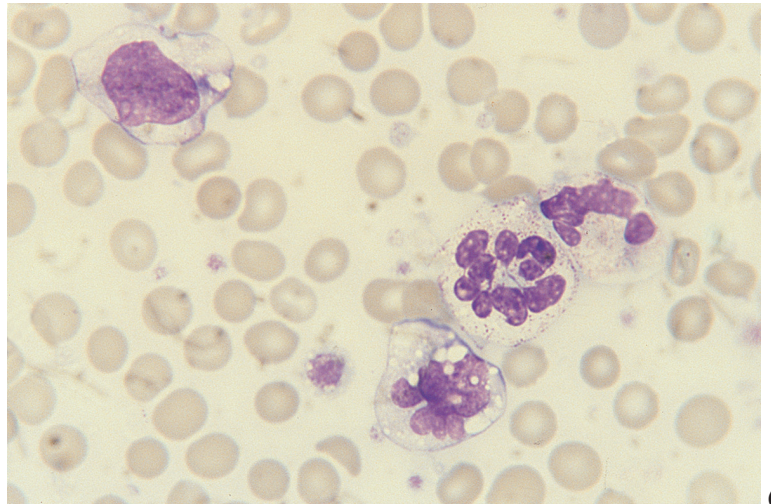
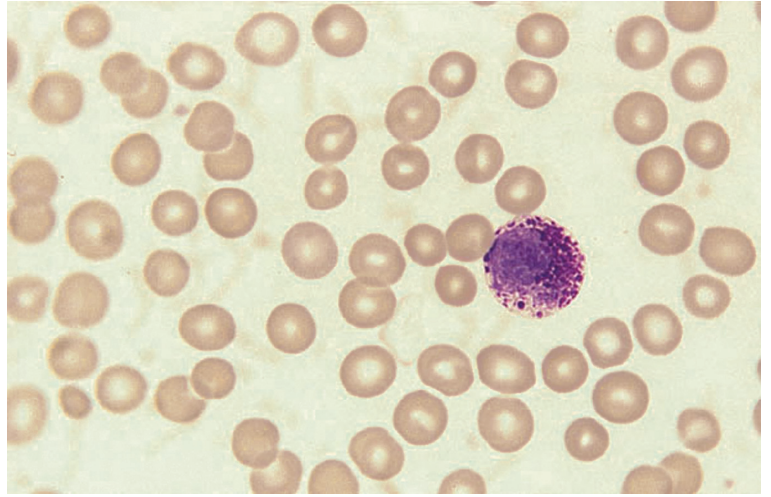
Leucemia mielóide crônica atípica

LMC atípica é uma doença de adultos. Os aspectos clínicos são semelhantes aos de LMC.

Hemograma

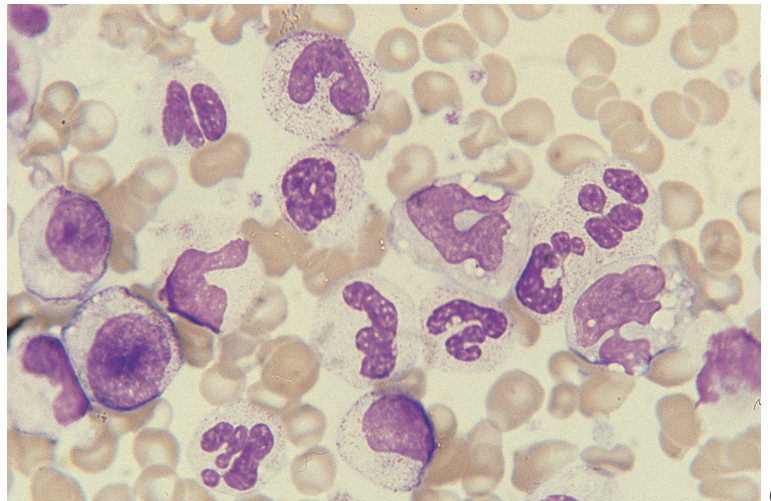
Os pacientes são anêmicos e apresentam-se com leucocitose, de moderada a acentuada. Pacientes com LMC atípica apresentam-se com Hb e contagem de leucócitos em geral mais baixas do que pacientes com LMC. Os aspectos do sangue periférico (Figura 9.50) diferem dos da LMC: monocitose e trombocitopenia são comuns, enquanto basofilia e eosinofilia são menos comuns. Precursores granulocíticos estão presentes; aspectos displásicos são

FIGURA 9.49 Distensão sanguínea mostrando um mastócito circulante com núcleo maior e citoplasma menos granular do que os mastócitos normais.



(a)

FIGURA 9.50 Distensão sanguínea de LMC atípica mostrando: (a) um neutrófilo normal, um macropolcítico, um monócito e um monócito um pouco imaturo – há uma plaqueta grande; (b) numerosos neutrófilos, formas em bastão, monócitos e mielócitos hipogranulares.



(b)

comuns. Em comparação com a leucemia mielo-monocítica crônica (LMMC), há mais precursores granulocíticos no sangue periférico, monócitos são menos numerosos e há aspectos displásicos mais chamativos. Os critérios diagnósticos da OMS, em comparação com os critérios diagnósticos para LMMC, estão na Tabela 9.11. A LMC atípica pode sofrer transformação blástica terminal.

Diagnóstico diferencial

Inclui reações leucemoides e os demais tipos de leucemias mieloides.

Exames adicionais

A aspiração da medula óssea (mielograma) e a análise citogenética podem ser úteis para o diagnóstico – por exemplo, para avaliar a eritropoese e a megacariopoese e para excluir LMA. De modo geral, os aspectos do sangue periférico são mais importantes do que os da medula na caracterização de SMD/NMP. O cromossomo Filadélfia não é detectado, mas podem ocorrer outras anormalidades citogenéticas clonais. O gene de fusão *BCR-ABL1* está ausente. O escore LAP é baixo na maioria dos pacientes e elevado em uma minoria, e não é um teste útil.

Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)

A LMMC é principalmente uma doença de idosos, caracterizada por anemia, hepatosplenomegalia e, algumas vezes, significativa infiltração dos tecidos por monócitos leucêmicos.

TABELA 9.11 Critérios de 2008 da OMS para o diagnóstico de leucemia mieloide crônica (LMC) atípica e de leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) para distinção entre ambas [108, 109]

	LMC atípica*	LMMC*
Monócitos no sangue periférico	< 10% dos leucócitos	> 1 × 10 ³ /μL, quase sempre > 10% dos leucócitos
Granulócitos imaturos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos) no sangue periférico	Ao menos 10% dos leucócitos	Em geral < 10% dos leucócitos
Displasia	Displasia granulocítica	Displasia em ao menos uma linhagem mieloide ou presença de critérios alternativos†

*Ambas as condições são negativas para *t(9;22)* e *BCR-ABL1* e têm < 20% de blastos mais promonócitos no sangue periférico.

†Se não houver displasia em ao menos uma linhagem, devem estar presentes uma anormalidade citogenética clonal **ou** a monocitose deve persistir por mais de 3 meses **e** haver exclusão de todas as outras causas de monocitose.

Hemograma

A distensão sanguínea (Figura 9.51) mostra monocitose e, na maioria dos casos, há anemia e neutrofilia. Por definição, a contagem de monócitos deve ser > 1 × 10³/μL (ver Tabela 9.11). Os monócitos podem ser um pouco imaturos, com basofilia citoplasmática ou nucléolos. Podem ocorrer

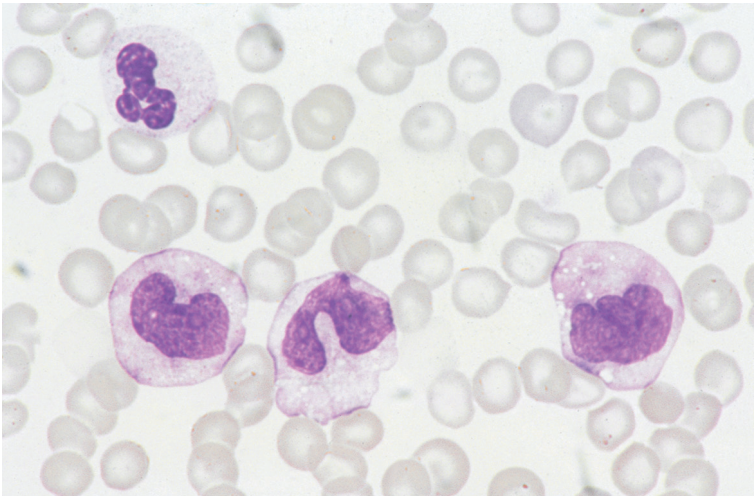


FIGURA 9.51 Distensão sanguínea em LMMC, mostrando um neutrófilo hipogranulado e três monócitos anormais.

precursores dos granulócitos, mas estes geralmente constituem menos de 5% dos leucócitos, enquanto na LMC atípica há um número significativo de granulócitos imaturos, com frequência acima de 15% e quase sempre acima de 5%. Basofilia e eosinofilia são muito incomuns. Blastos mais promonócitos na medula óssea estão abaixo de 20%. Com frequência, mas não invariavelmente, observam-se aspectos displásicos nas outras linhagens.

A LMMC pode terminar evoluindo para LMA.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com condições reacionais, outros tipos de leucemias mieloides crônicas, com SMD e NMP. A resposta à administração de G-CSF pode gerar um hemograma que simula LMMC. É necessária uma distinção cuidadosa entre promonócitos e monócitos atípicos ou imaturos para evitar a confusão diagnóstica de LMMC com leucemia monocítica aguda.

Exames adicionais

A aspiração e a biópsia da medula óssea, bem como a análise citogenética, são úteis ao diagnóstico. O cromossomo Filadélfia e o gene de fusão *BCR-ABL1* não são detectados, mas podem ocorrer outras anormalidades citogenéticas clonais.

Leucemia mielomonocítica infantil*

Crianças podem apresentar LMC Filadélfia-positiva típica, embora isso seja raro antes da adolescência.

*N. de T. Em inglês. *juvenile myelomonocytic leukaemia*; o termo “juvenile” deve ser traduzido por “infantil”, pois a doença ocorre abaixo dos 5 anos, com pico de incidência aos 2 anos de idade.

Crianças com menos de 5 anos também podem desenvolver uma leucemia diferente, Filadélfia-negativa, antes conhecida como leucemia mieloide crônica infantil e agora designada leucemia mielomonocítica infantil, que engloba a síndrome da monossomia 7 da infância. Os aspectos clínicos são anemia e esplenomegalia, algumas vezes hepatomegalia e linfonodomegalias, além de *rash* cutâneo. A doença é mais prevalente em crianças com neurofibromatose ou síndrome de Noonan.

Hemograma

O hemograma mostra anemia, neutrofilia e monocitose. Em comparação com a LMC, a leucocitose é geralmente menor e há menos mielócitos; monocitose, trombocitopenia e eritroblastos circulantes constituem o aspecto comum. A monocitose é particularmente importante para o diagnóstico, pois é praticamente constante. Há aspectos displásicos (Figura 9.52). Os critérios diagnósticos propostos pela OMS são mostrados na Tabela 9.12. Alta contagem de blastos, grande número de eritroblastos e baixa contagem de plaquetas são indicativos de pior prognóstico [111].

A doença pode terminar em transformação aguda, mas progressão lenta e morte sem transformação são mais comuns.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com condições reacionais que provoquem monocitose e aspectos displásicos em crianças pequenas, especialmente infecções virais e bacterianas. Deve-se notar que crianças com síndrome de Noonan, além de terem incidência aumentada

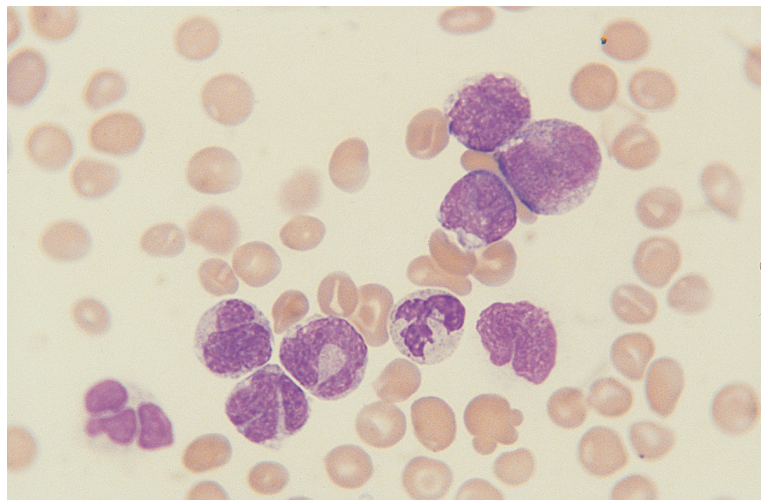


FIGURA 9.52 Distensão sanguínea em LMM infantil, mostrando vários neutrófilos, um blasto, um promielócito e várias células muito displásicas, que aparentam ser de linhagem monocítica. O paciente era uma criança de 6 meses com hepatosplenomegalia, leucócitos $94 \times 10^3/\mu\text{L}$, Hb 10,2 g/dL, plaquetas $28 \times 10^3/\mu\text{L}$, escore LAP 10 e hemoglobina F 11%. Cortesia dos Drs. O. Oakhill e G.R. Standen, Bristol.

TABELA 9.12 Critérios de 2008 OMS para o diagnóstico de leucemia mielomonocítica infantil [110]

1. Contagem de monócitos > 1 × 10 ³ /μL
2. Blastos mais monócitos < 20% no sangue periférico e na medula óssea
3. Ausência do cromossomo Ph (Filadélfia) e do gene de fusão <i>BCR-ABL1</i>
4. Dois ou mais dos seguintes: Porcentagem de hemoglobina F aumentada para a idade Granulócitos imaturos no sangue periférico Contagem de leucócitos > 10 × 10 ³ /μL Presença de anormalidade cromossômica clonal Hipersensibilidade dos progenitores mieloides ao fator estimulante de colônias granulocíticas e macrófágicas <i>in vitro</i>

de LMM infantil, podem desenvolver uma condição transitória, com remissão espontânea, que se assemelha à LMM infantil.

Exames adicionais

São indicadas aspiração da medula, análise citogenética e dosagem de hemoglobina F. A citogenética é geralmente normal na apresentação, mas monossomia 7, trissomia 8 ou outra alteração citogenética podem estar presentes ou apresentar-se durante a evolução. Análise molecular é indicada porque frequentemente há mutações de *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *ASXL1* ou *CBL*, ou inativação bialélica de *NFI*. Além de aumento da porcentagem de hemoglobina F, podem estar presentes outros aspectos de hematopoese fetal, como baixa de hemoglobina A₂

e de anidrase carbônica eritrocitária, expressão reduzida do antígeno I eritrocitário e aumentada do antígeno i. Pode haver aumento de imunoglobulinas séricas. O escore da LAP pode ser alto, normal ou baixo, de modo que não tem utilidade.

Neoplasia mielodisplásica/ mieloproliferativa, inclassificável

Essa condição tem aspectos intermediários entre SMD e NMP, mas não corresponde aos critérios das condições descritas anteriormente [112]. Nessa categoria está incluída a anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose.

Hemograma

O hemograma mostra aspectos proliferativos como uma contagem de leucócitos > 13 × 10³/μL, contagem de plaquetas > 450 × 10³/μL ou mais. Pode haver blastos, mas, por definição, abaixo de 20% dos leucócitos. Além disso, há aspectos displásicos afetando uma ou mais linhagens. Em pacientes com anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose, podem ser vistos eritrócitos hipocrômicos e corpos de Pappenheimer (Figura 9.53).

Diagnóstico diferencial

Inclui SMD, NMP e outras SMDs/NMPs.

Exames adicionais

Incluem aspirado e biópsia de medula óssea, análise citogenética e análise molecular para uma mutação *JAK2*, *MPL* ou *CARLR*.

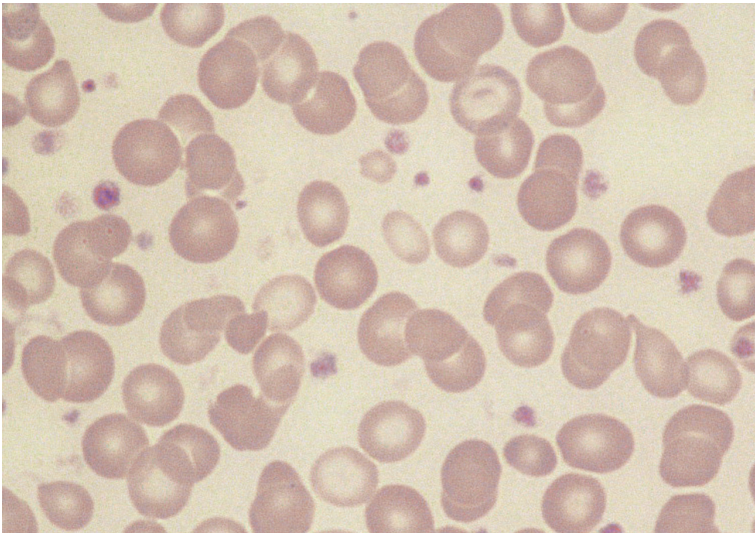


FIGURA 9.53 Distensão sanguínea em anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose, mostrando população dimórfica de eritrócitos e trombocitose com plaquetas grandes e granularidade variável.

Neoplasias linfoides e mieloides com anormalidades de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1*

Esse grupo de neoplasias é definido por suas anormalidades moleculares específicas [107]. Os aspectos hematológicos diferem. A anormalidade mais comum que causa o rearranjo *PDGFRA* é uma deleção intersticial críptica ocasionando o gene de fusão *FIP1L1-PDGFRA*. Essa condição na maioria das vezes manifesta-se com leucemia eosinofílica crônica, mas também pode manifestar-se como LMA secundária ou linfoma linfoblástico T. Casos com rearranjo de *PDGFRB*, inclusive os que também têm t(5;12)(q31~33;p12) e *ETV6-PDGFRB*, geralmente apresentam-se como uma neoplasia mieloide assemelhada a LMC atípica ou LMMC, muitas vezes com eosinofilia. Casos com rearranjo *FGFR1*, entre os quais o mais comum é t(8;13)(p11;q12) com *ZNF198-FGFR1*, podem apresentar-se como leucemia eosinofílica crônica, LMA, linfoma linfoblástico T ou linfoma linfoblástico B.

Hemograma

Eosinofilia é usual mas não invariavelmente presente (Figura 9.54). Outros aspectos hematológicos variam de acordo com os genes específicos envolvidos.

Diagnóstico diferencial

É importante que essas condições sejam distinguidas de outras NMPs e SMDs/NMPs com aspectos

hematológicos similares, pois casos com rearranjo de *PDGFRA* e *PDGFRB* são responsivos a inibidores de tirosinaquinase.

Exames adicionais

Rearranjos de *PDGFRB* e *FGFR1* são detectados à análise citogenética. A fusão *FIP1L1-PDGFRA*, entretanto, é silente à citogenética; como se deve a uma deleção intersticial, a detecção requer FISH ou análise molecular, especificamente uma reação em cadeia da polimerase (*nested PCR*).

Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

A LLA é mais frequente em crianças com menos de 10 anos, mas persiste ocorrendo durante toda a infância, a adolescência e a vida adulta, com um segundo aumento de incidência na velhice. Alguns aspectos clínicos decorrem da proliferação de células leucêmicas, como dor óssea, hepatosplenomegalia e linfonodomegalias; outros são consequência indireta da infiltração leucêmica da medula óssea, como palidez e manifestações hemorrágicas. A LLA pode ser de linhagem T ou B. A classificação FAB foi feita com base na citologia [80], ao passo que a classificação da OMS baseia-se na imunofenotipagem e, até certo ponto, em análise genética molecular, e usa uma designação mais ampla: leucemia/linfoma linfoblástico B ou T [79]. O grupo FAB classificou a LLA morfolologicamente em L1, L2 e L3. Na LLA L1 (Figura 9.55), as células blásticas são pequenas ou de tamanho médio e têm aparência uniforme;

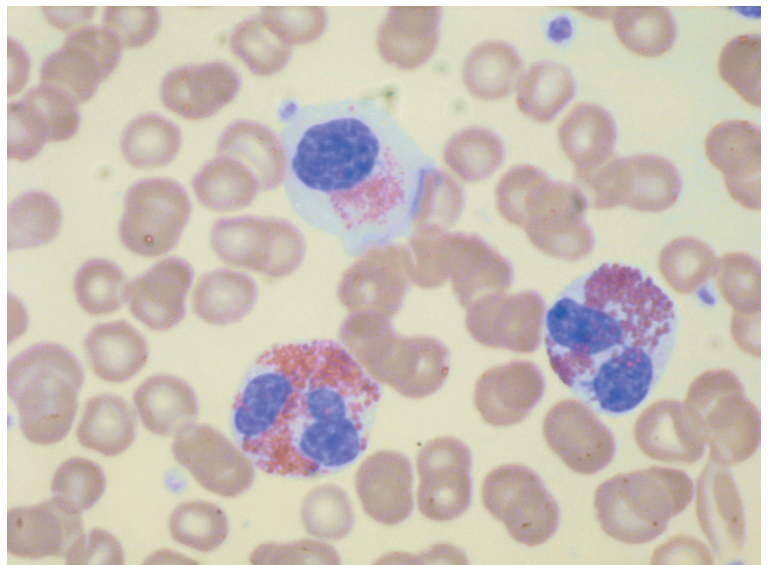


FIGURA 9.54 Distensão sanguínea de paciente com leucemia eosinofílica crônica associada com um gene de fusão *FIP1L1-PDGFRA*, mostrando eosinófilos com grau variado de desgranulação, um deles não lobulado.

as células maiores têm cromatina difusa e podem ter pequenos nucléolos, ao passo que as menores não têm nucléolo visível e mostram alguma condensação da cromatina. O citoplasma é escasso, de leve a moderadamente basófilo, às vezes com vacúolos. Na LLA L2 (Figura 9.56), os blastos são maiores e mais pleomórficos, com núcleos irregulares, nucléolos mais proeminentes e citoplasma mais abundante. O citoplasma é fraco a fortemente basófilo, podendo conter alguns vacúolos. A LLA L3 (Figura 9.57) caracteriza-se por basofilia citoplasmática intensa e vacuolização citoplasmática variável, mas geralmente proeminente.

A classificação FAB atualmente tem pouca aplicação, exceto por servir como referência quanto à morfologia. Casos com citologia L1 têm alta probabilidade de serem de fato LLA, ao passo que em casos com citologia L2 a imunofenotipagem mostra algumas vezes tratar-se de LMA sem evidências de diferenciação. Havendo citologia L3, o observador deve alertar-se de que o caso pode representar algumas vezes, mas nem sempre, a fase leucêmica de um linfoma de Burkitt, e não uma LLA. A classificação da OMS é mostrada na Tabela 9.13.

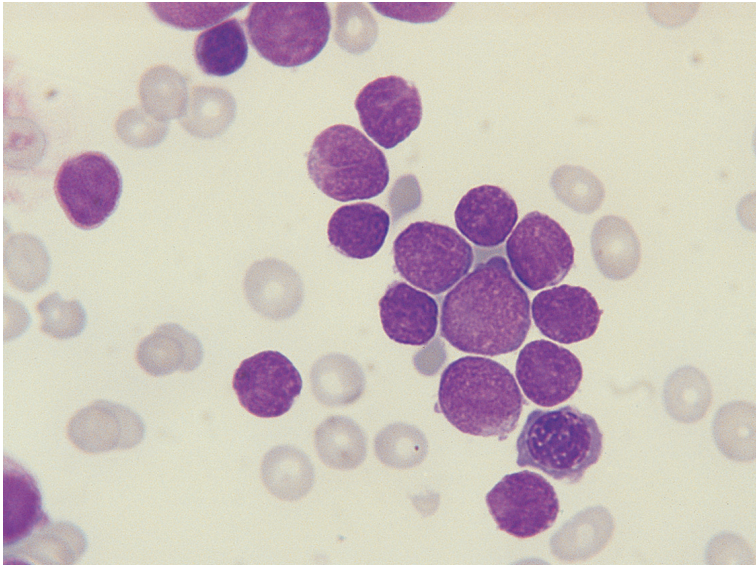


FIGURA 9.55 Distensão sanguínea de FAB LLA L1, mostrando linfoblastos e um eritroblasto. Os linfoblastos têm tamanho variável, mas morfologia relativamente uniforme. As células blásticas menores mostram alguma condensação de cromatina, o que pode ser um aspecto de linfoblastos, mas não de mieloblastos. A imunofenotipagem mostrou ser de linhagem B.

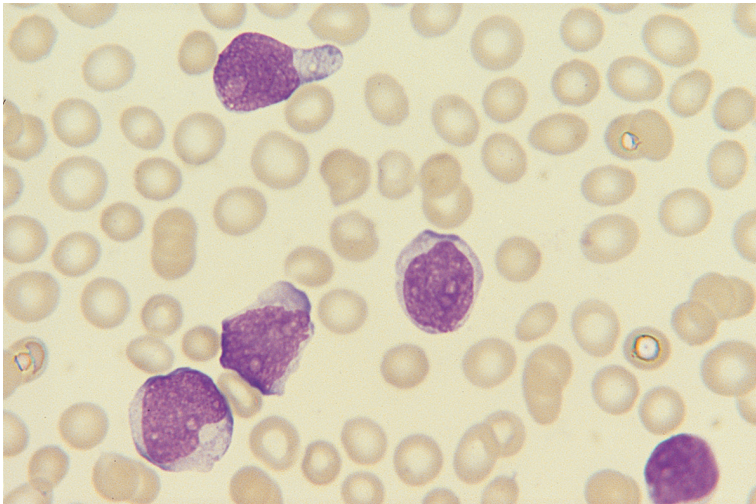


FIGURA 9.56 Distensão sanguínea de FAB LLA L2. As células blásticas são maiores e mais pleomórficas do que na LLA L1, e, neste caso, têm padrão de cromatina mais difuso; um dos blastos apresenta conformação em espelho de mão. A imunofenotipagem mostrou ser de linhagem T.

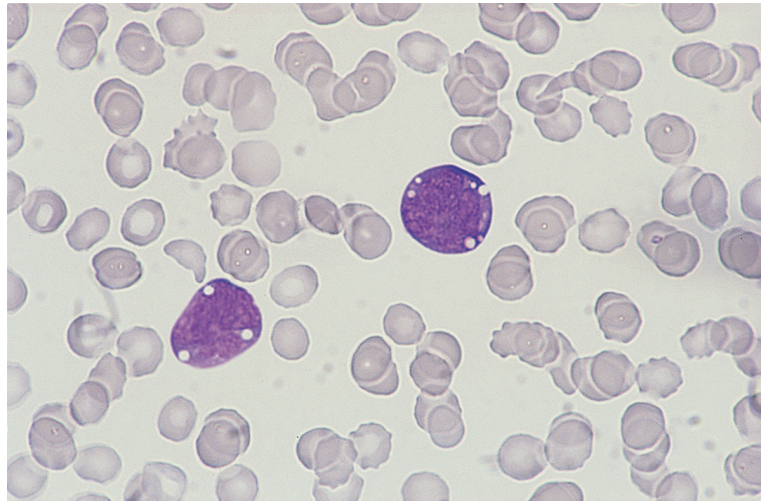


FIGURA 9.57 Distensão sanguínea de FAB LLA L3. As células blásticas são de tamanho médio, com citoplasma vacuolizado fortemente basófilo. Este caso mostrou ter um imunofenótipo de células B maduras.

TABELA 9.13 Classificação de 2008 da OMS de neoplasias de precursores linfóides (leucemia/linfoma linfoblástico agudo) [79]

Leucemia/linfoma linfoblástico B, sem outras especificações
Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q;23); com rearranjo <i>MLL (KMT2A)</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico T

Hemograma

Alguns casos apresentam-se com anemia e trombocitopenia sem células leucêmicas circulantes; outros têm um número variável de linfoblastos no sangue, com contagem de leucócitos às vezes consideravelmente elevada. Em geral, há anemia, neutropenia e trombocitopenia, mas, às vezes, ao diagnóstico ainda há número normal de neutrófilos e/ou plaquetas. Raros pacientes apresentam trombocitose [113]. Eosinofilia reacional é vista em uma minoria de pacientes. As categorias da OMS não descrevem aspectos distintivos, exceto a LLA de linhagem B com t(5;14)(q31;q32), na qual há acentuada eosinofilia reacional como decorrência de desregulação do gene *IL3* por proximidade ao locus *IGH* (Figura 9.58).

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser feito principalmente com a LMA e com as linfocitoses reacionais. Os blastos de alguns casos de LLA apresentam grânulos azurófilos, e os blastos de alguns casos de LMA não apresentam grânulos nem outros sinais de diferenciação mieloide ao microscópio óptico, por isso são necessários outros testes para uma diferenciação confiável das duas condições. Casos típicos de LLA da infância (FAB L1) quase sempre podem ser distinguidos de LMA por aspectos citológicos: em geral, há alguns blastos muito pequenos, quase do tamanho de um linfócito normal, e essas células apresentam condensação de cromatina, enquanto os blastos da LMA raramente são tão pequenos e em geral apresentam um padrão difuso de cromatina. Alguns casos de tumores de células pequenas com células neoplásicas circulantes, como o neuroblastoma, podem às vezes ser confundidos com LLA; imunofenotipagem pode ser necessária para que seja feita a distinção.

Em casos de LLA com poucos blastos circulantes, algumas vezes é preciso aprofundar a investigação hematológica, com mielograma, para distingui-los de uma infecção causal de linfocitose com linfócitos atípicos.

Em casos sem células leucêmicas circulantes, o diagnóstico diferencial inclui anemia aplástica e outras causas de insuficiência da medula óssea. Com frequência, surge a preocupação de saber se crianças com trombocitopenia severa, condizente com púrpura trombocitopênica autoimune aguda, sofrem, na verdade, de LLA; se não existirem células linfóides atípicas e anemia, isso é possível, mas

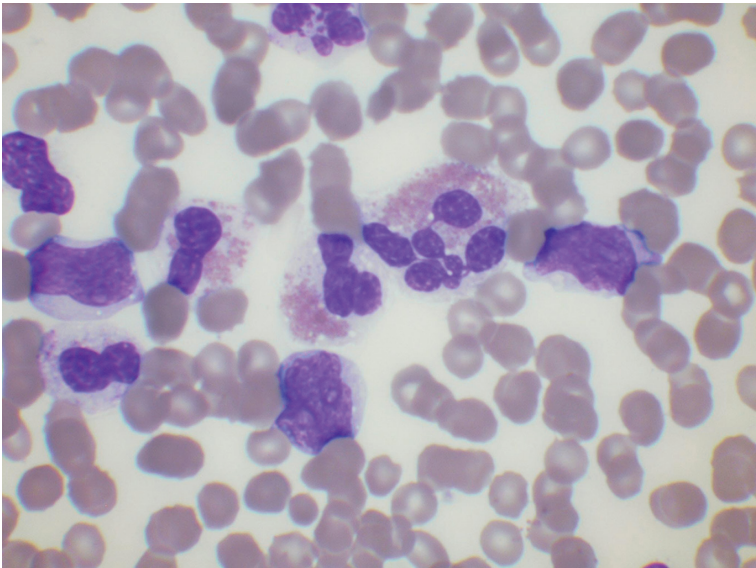


FIGURA 9.58 Distensão sangüínea de LLA associada com t(5;14)(q31;q32), mostrando linfoblastos leucêmicos e eosinofilia reacional. Os eosinófilos são citologicamente anormais, um com núcleo hiperlobulado, outros com diminuição do número de grânulos.

muito improvável; a menos que seja indicado tratamento com corticoides, o mielograma não é considerado necessário.

Exames adicionais

Para confirmar o diagnóstico de LLA, são essenciais a aspiração da medula óssea e a imunofenotipagem dos blastos do sangue periférico ou da medula óssea (Tabela 9.14). Também é recomendável fazer a análise citogenética, para identificar subgrupos de importância prognóstica. A análise molecular está se tornando cada vez mais importante, tanto para identificar casos de bom prognóstico, nos quais não há indicação de transplante de células-tronco em primeira remissão, como para identificar casos de mau prognóstico, nos quais justificam-se formas intensivas e inovadoras de tratamento. Citogenética ou análise molecular são essenciais para identificar casos Ph-positivos, *BCR-ABL1* positivos (25-30% dos pacientes adultos), que requerem tratamento com inibidores de tirosinaquinase.

Leucemias linfoides crônicas e linfomas

Tanto leucemias linfoides crônicas como linfomas são neoplasias linfoides. Por definição, nas leucemias linfoides crônicas, há células leucêmicas circulantes, enquanto os linfomas envolvem, principalmente, os linfonodos e outros tecidos. Os linfomas, contudo, podem apresentar uma fase leucêmica, tanto inicialmente como durante a progressão da doença. O termo “distúrbio linfoproliferativo”

TABELA 9.14 Achados imunofenotípicos característicos na leucemia linfoblástica aguda (expressão na membrana da superfície, salvo especificação em contrário)

Linhagem B	Linhagem T
Expressão de CD19, CD22, CD24, CD79a* e HLA-DR; TdT [†] e CD45 em geral expressos; expressão variável de CD34, CD10, CD20, CD79b e cadeia μ citoplasmática; FMC7 não expresso; a imunoglobulina na membrana geralmente não é expressa, e casos com essa expressão são mais bem classificados como linfoma, e não como LLA	Expressão de CD7, CD45, CD3 citoplasmático e TdT [†] nuclear; expressão variável de CD1a, CD2, CD3 na membrana, CD5, CD4, CD8, CD10 (mais fraco do que na linhagem B) e receptor de células T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$; HLA-DR em geral não expresso.

*Anticorpos monoclonais em uso detectam um epítipo citoplasmático.
†Desoxinucleotidil transferase terminal, expressão nuclear.

inclui tanto as leucemias como os linfomas. O diagnóstico deve basear-se em aspectos clínicos, hemograma com cuidadosa citologia e imunofenótipo, suplementados, quando necessário, por análise citogenética e molecular. Em alguns casos, também é necessário o exame histopatológico da medula óssea ou dos linfonodos. Neste livro, serão discutidos em detalhes apenas os aspectos do sangue periférico. Para mais informações sobre o imunofenótipo e a histologia, consultar as Tabelas 9.15 e 9.16 e as Referências 84 e 114 a 116.

TABELA 9.15 Achados imunofenotípicos característicos nas leucemias linfoides crônicas e nos linfomas de linhagem B*

Condição		Imunofenótipo	
Leucemia linfocítica crônica		Expressão fraca de Smlg; expressão de CD5 e CD23; falta de expressão ou expressão fraca de CD20, CD22 e CD79b; CD35 e FMC7 não expressos; CD200 forte	
Leucemia prolinfocítica B, tricoleucemia (<i>hairy cell leukaemia</i>) e linfomas	Leucemia prolinfocítica	Expressão moderada ou forte de Smlg; falta de expressão de CD23; expressão de FMC7, CD20, CD22, CD35 e CD79b; expressão variável de CD5 e CD10	
	Tricoleucemia (<i>hairy cell leukaemia</i>)		Smlg forte, expressão de CD11c, CD25, CD103, e CD123; CD22 e CD200 fortemente expressos
	Linfoma folicular		CD10 geralmente expresso neste subtipo
	Linfoma de células do manto		Expressão de CD5 e ciclina nuclear D1, CD200 fraco
	Linfoma esplênico com linfócitos vilosos		CD11c e CD103 às vezes expressos
	Linfoma de grandes células B		Expressão variável de CD5 e CD10
Leucemia plasmocítica		Expressão de imunoglobulina citoplasmática monotípica (κ ou λ), mas não Smlg; expressão de CD38 e CD138	

Smlg, imunoglobulina da superfície de membrana.

*Todas as neoplasias deste grupo costumam expressar imunoglobulinas de superfície da membrana (Smlg), CD19 e CD79a (epítipo citoplasmático); expressam fortemente CD37, que é expresso fracamente por células T; expressam CD40, que é expresso por algumas células mieloides mas não por células T; não expressam desoxinucleotidil transferase terminal (TdT).

Distúrbios linfoproliferativos de linhagem B

Leucemia linfocítica crônica (LLC)

A LLC é uma condição crônica caracterizada por acúmulo de pequenos linfócitos B maduros, com desenvolvimento consequente de linfonodomegalias,

hepatomegalia e esplenomegalia. Casos iniciais podem estar ainda sem sinais físicos nem sintomas, sendo feito o diagnóstico incidentalmente, por um hemograma de rotina. O sangue periférico e a medula óssea estão sempre envolvidos.

TABELA 9.16 Achados imunofenotípicos característicos nos distúrbios linfoproliferativos crônicos de linhagens T e NK (*natural killer*)

Condição		Imunofenótipo	
Leucemia prolinfocítica T	Expressão variável de CD2, CD3, CD5 e CD7; CD1 e TdT não expressos; expressão do receptor de células T αβ ou γδ	CD4 e CD7 geralmente expressos	
Síndrome de Sézary/micose fungoide		CD4 geralmente expresso	
Leucemia/linfoma de células T do adulto		CD4 e CD25 geralmente expressos; HLA-DR expresso na metade e CD38 em dois terços dos pacientes	
Linfoma de grandes células T			
Leucemia de linfócitos grandes e granulares (células T)		Geralmente expressão de CD2, CD3, CD8, CD57 e receptor de células T αβ; CD4 e CD16 geralmente não expressos	
Leucemia de linfócitos grandes e granulares (células NK)	CD3 e receptor de células T não expressos; CD1a e desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) não expressos	Expressão variável de CD2 e CD8; CD4 geralmente não expresso; expressão de CD11b, CD16, CD56 e, às vezes, CD57; expressão de CD158a, CD158b ou CD158e, ou falta de expressão de qualquer epítipo CD158	

Hemograma

As contagens de leucócitos e de linfócitos variam de pouco acima do normal a muito elevadas. A Hb e a contagem de plaquetas podem ser normais ou reduzidas. Em pacientes não tratados, a contagem de neutrófilos raramente está reduzida. Os linfócitos são de tamanho semelhante ao normal, mas com aparência mais uniforme (Figura 9.59). Em geral, a cromatina é aglomerada, e os nucléolos são pequenos e inconspícuos. O citoplasma é escasso e fracamente basófilo. Raramente, há cristais citoplasmáticos (Figura 9.60), inclusões globosas [117] ou grânulos azurófilos [118]. Inclusões vermiformes, representando imunoglobulina em cisternas dilatadas de retículo endoplasmático, também têm sido descritas [119]. Como as células de LLC apresentam maior fragilidade mecânica, costuma haver apreciável número de células amassadas (restos de Gumprecht) na distensão sanguínea. Pode haver um pequeno número de células maiores, com nucléolos proeminentes, assemelhando-se às células da leucemia prolinfocítica (LPL). Se houver mais de 10% de prolinfócitos ou se o grau de pleomorfismo for superior ao normal, prefere-se o diagnóstico de LLC de tipo celular misto (LLC/LPL) [115]. A anemia é geralmente normocítica e normocrômica. Quando a LLC se complica com anemia hemolítica autoimune, há policromatofilia e esferócitos.

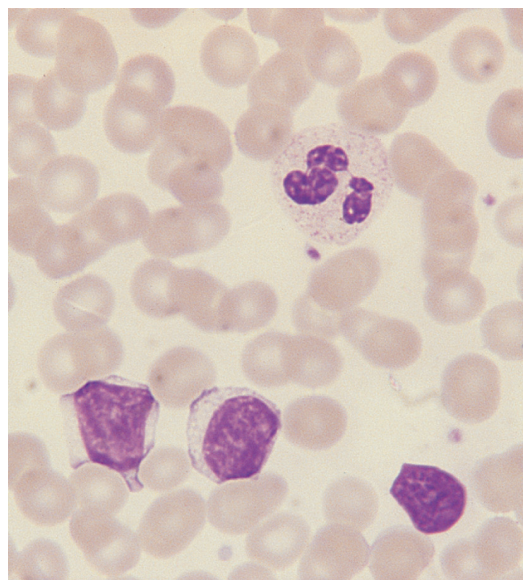


FIGURA 9.59 Distensão sanguínea de LLC mostrando um neutrófilo, dois linfócitos maduros e uma célula amassada.

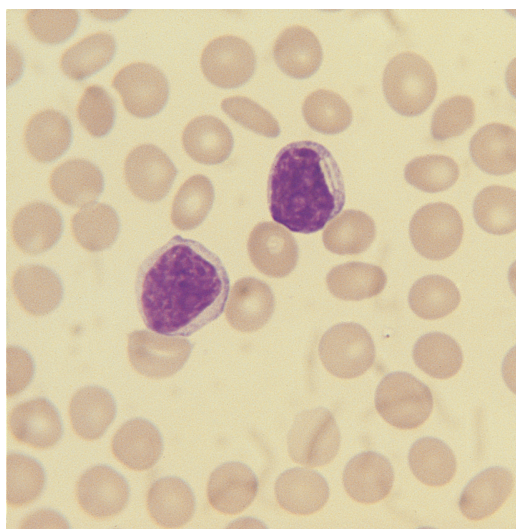


FIGURA 9.60 Distensão sanguínea de LLC mostrando dois linfócitos, um deles contendo dois cristais. Cortesia do Professor Daniel Catovsky, Londres.

Instrumentos automáticos mostram o aumento de linfócitos, às vezes com *flag* para linfócitos atípicos. Na série Siemens Advia, há aumento de LUCs (células grandes não coradas pela peroxidase). Pode haver falsa basofilia. Quando há anemia hemolítica autoimune associada, o citograma eritroide mostra a presença de eritrócitos hiperocrômicos (Figura 9.61).

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outros distúrbios linfoproliferativos crônicos, particularmente com linfoma folicular, LELV, também denominado linfoma esplênico da zona marginal, linfoma de células do manto e a variante de pequenas células da LPL de linhagem T. Entre as condições benignas que podem ser confundidas com a LLC, destacam-se a linfocitose pós-esplenectomia e a induzida pelo estresse agudo. Se a distensão sanguínea for examinada sem referência à idade e aos aspectos clínicos, também coqueluche e linfocitose infecciosa podem ser confundidas com LLC.

Exames adicionais

Deve-se confirmar o diagnóstico por imunofenotipagem (ver Tabela 9.15), que pode ser complementada por análise citogenética (particularmente FISH) e por biópsia da medula óssea.

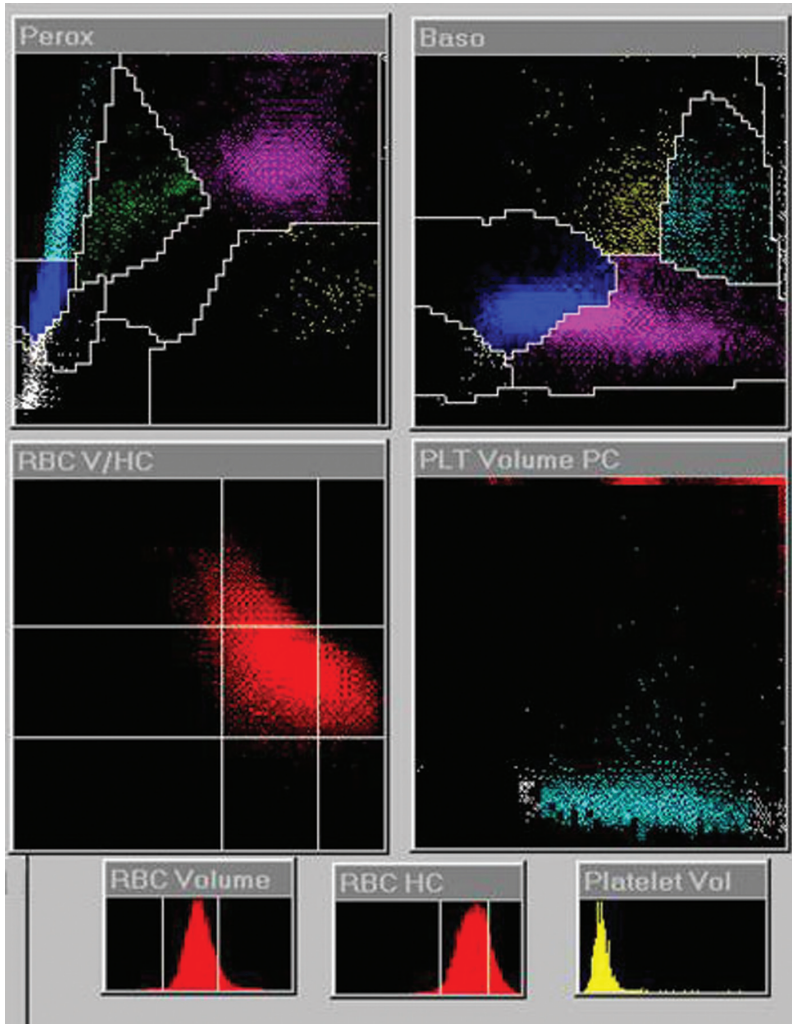


FIGURA 9.61 Histogramas e citograma eritroide de paciente com LLC complicada com anemia hemolítica autoimune. A contagem de linfócitos era $59,26 \times 10^3/\mu\text{L}$, com uma alta contagem de células grandes não coradas (LUCs) de $3,14 \times 10^3/\mu\text{L}$ e discreta pseudobasofilia ($0,55 \times 10^3/\mu\text{L}$). Havia 15% de eritrócitos hiperocrômicos e também um aumento de macrócitos atribuído à reticulocitose. Cortesia da Professora Gina Zini, Roma.

Linfocitose monoclonal de células B

Linfocitose monoclonal de células B, ou linfocitose monoclonal de significação indeterminada, é uma condição assintomática que às vezes é detectada em pessoas aparentemente saudáveis. Os linfócitos B clonais podem ter o mesmo imunofenótipo de LLC ou de linfoma, CD5-positivo ou CD5-negativo, inclusive com o mesmo fenótipo de LELV. A probabilidade de essa condição evoluir para um distúrbio linfoproliferativo declarado ainda não está determinada, mas já se sabe que, em curto prazo, a condição pode regredir, manter-se estável ou progredir.

Hemograma

As contagens de glóbulos podem ser normais ou haver leve linfocitose. Na distensão, podem ser vistos alguns linfócitos esmagados.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com os distúrbios linfoproliferativos declarados. Foram propostos critérios de diferenciação [120].

Exames adicionais

O diagnóstico depende de fazer imunofenotipagem em indivíduos com leve linfocitose ou, como parte

de projeto de pesquisa, em indivíduos hematologicamente normais. Essa condição foi detectada como resultado da observação de inclusões cristalinas em linfócitos, levando à imunofenotipagem [121]. Às vezes, há uma paraproteína em baixa concentração. Não são indicados outros exames.

Leucemia prolinfocítica de linhagem B

A leucemia prolinfocítica de linhagem B (B-LPL) caracteriza-se clinicamente por esplenomegalia acentuada, com linfonodomegalias apenas discretas. O sangue periférico e a medula óssea estão sempre envolvidos. Podem ocorrer anemia e outras citopenias. A doença progride mais rapidamente do que a LLC.

Hemograma

A contagem de leucócitos está geralmente muito elevada. As células neoplásicas são maiores e de tamanho mais variado do que as da LLC. São predominantemente redondas, com núcleos também redondos e citoplasma fracamente basófilo, mais abundante do que na LLC (Figura 9.62). Muitas células, em particular as maiores, apresentam nucléolos grandes e proeminentes. Há uma condensação moderada da cromatina, mais acentuada em torno do grande nucléolo, dando-lhe uma aparência “vesicular”. Se as distensões de sangue secarem lentamente, as células murcham e formam projeções artefatuais de aspecto capilar e os nucléolos tornam-se menos conspícuos [122].

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outros distúrbios linfoproliferativos crônicos, em particular com LLC/LPL, linfoma de células do manto e LPL de linhagem T. O melhor

critério morfológico para distinguir B-LPL de LLC/LPL é a presença, na primeira, de ao menos 55% de prolinfócitos dentre as células linfoides circulantes [123]. A possibilidade diagnóstica de linfoma de células do manto deve ser excluída por imunofenotipagem, incluindo investigação da expressão da ciclina D1, e por FISH ou análise molecular. Na LPL de linhagem T, as células apresentam formato mais irregular, são mais pleomórficas e, em geral, menores do que as da B-LPL. Algumas vezes, a fase leucêmica do linfoma de células grandes assemelha-se à B-LPL, mas em geral mostra-se com pleomorfismo muito mais acentuado. A leucemia plasmocítica também pode ser difícil de distinguir, mas geralmente há algumas, ou muitas, células com aspecto plasmocitoide evidente, com núcleo excêntrico, basofilia citoplasmática intensa e zona de Golgi paranuclear.

Exames adicionais

A imunofenotipagem (ver Tabela 9.15) sustenta o diagnóstico presuntivo de B-LPL, distinguindo-a da leucemia plasmocítica. A análise citogenética pode mostrar anomalias que incluem trissomia 3 e rearranjos, com um *breakpoint* em 14q32. Também foi descrita $t(11;14)(q13;q32)$, mas esses casos devem ser mais considerados como linfoma de células do manto.

Tricoleucemia (*hairy cell leukaemia* [HCL])

A HCL* é um distúrbio linfoproliferativo crônico, caracterizado por esplenomegalia sem linfono-

*N. de T. O termo em inglês *hairy cell leukaemia* (HCL) é internacionalmente usado, sendo preferido à tradução vernacular “tricoleucemia” ou à mais vulgar “leucemia de células cabeludas, ou (pilosas)”.

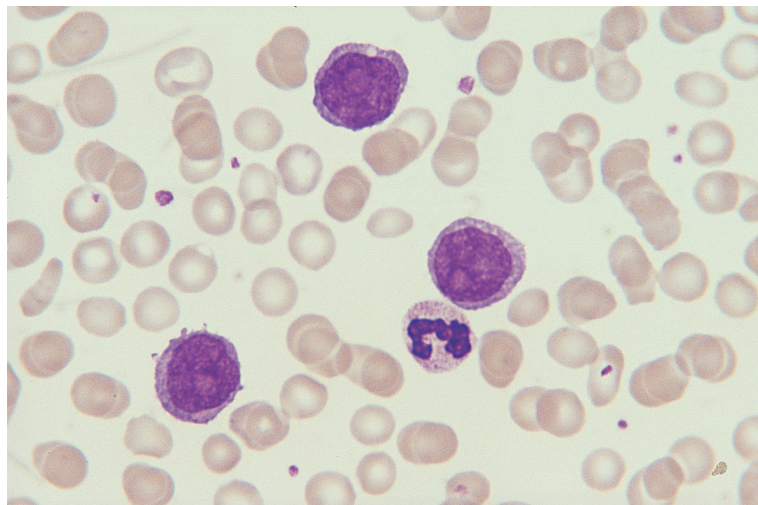
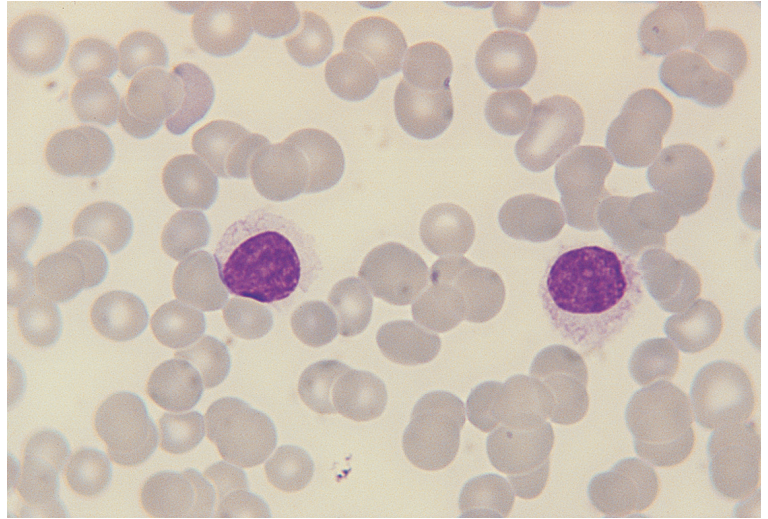


FIGURA 9.62 Distensão sanguínea de LPL de linhagem B mostrando um neutrófilo e três prolinfócitos com nucléolos vesiculares característicos.

FIGURA 9.63 Distensão sanguínea de HCL, mostrando duas *hairy cells*; ambas têm abundante citoplasma com margens irregulares e, em uma delas, observam-se finas projeções de aspecto piloso.



domegalias. Os casos iniciais não apresentam achados físicos anormais, com o diagnóstico feito incidentalmente pela(s) citopenia(s).

Hemograma

A contagem de leucócitos em geral não está elevada, sendo raras as *hairy cells* (Figura 9.63) no sangue periférico; na suspeita diagnóstica, não sendo encontradas ao exame da distensão, uma preparação de concentrado de leucócitos (*buffy coat*) pode ser útil. Em geral, há anemia normocítica e acentuada monocitopenia. Em casos avançados, também há neutropenia e trombocitopenia. *Hairy cells* são maiores do que linfócitos normais; têm citoplasma abundante fracamente basófilo, com margens “cabeludas” irregulares. Às vezes, observam-se inclusões citoplasmáticas, que representam o complexo ribossômico-lamelar identificado pela microscopia eletrônica; à microscopia óptica, essas inclusões aparecem como duas linhas paralelas indistintas (Figura 9.64). O núcleo pode ser redondo, oval, em formato de halteres ou bilobado. A aparência é delicada, com pouca condensação da cromatina; algumas vezes, há um nucléolo indistinto.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com outros distúrbios linfoproliferativos, em particular com a forma variante da própria *hairy cell leukaemia* e com o LELV. As *hairy cells* não têm nucléolo proeminente como as células da forma variante e têm citoplasma mais abundante do que as células de LELV. Como pode ocorrer pancitopenia com escassez de células leucêmicas, pode-se confundir a HCL com a anemia aplástica. Um indicador útil

para um diagnóstico correto é a redução desproporcional da contagem de monócitos na HCL. Uma condição parecida com a HCL, mas com uma contagem de leucócitos mais alta e imunofenótipo diferente, foi descrita no Japão [124]. Também no Japão, há relatos de casos de proliferação policlonal de linfócitos com o aspecto de *hairy cells* [124].

Exames adicionais

O diagnóstico é confirmado pela imunofenotipagem [114] (ver Tabela 9.15), pela atividade TRAP e pela histologia da biópsia da medula óssea – altamente característica –, na qual as células neoplásicas

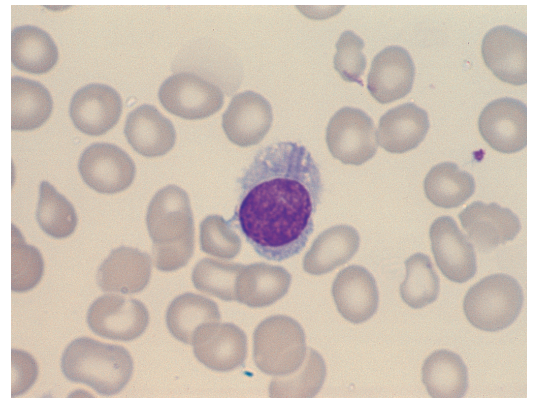


FIGURA 9.64 Distensão sanguínea de HCL, mostrando uma *hairy cell* contendo um complexo ribossômico-lamelar. Essas estruturas são mais fáceis de observar pelo exame ultraestrutural, mas algumas vezes podem ser identificadas pelo microscópio óptico como duas linhas paralelas basófilas. Cortesia da Dra. Laura Sainati, Pádua, e do Professor Daniel Catovsky.

parecem afastadas umas das outras. Análise genética molecular mostra rearranjo do gene *BRAF*. Pode haver anormalidades citogenéticas clonais, mas não foi identificado nenhum rearranjo característico.

Variante da HCL

Há uma forma variante de HCL, com aspectos clínicos semelhantes, mas diferindo em alguns aspectos hematológicos, citológicos e imunofenotípicos; parece mais adequado considerá-la uma condição diferente.

Hemograma

Na variante da HCL, a contagem de leucócitos está geralmente elevada, pela presença de numerosas células neoplásicas. Não há monocitopenia grave. Os demais aspectos hematológicos são semelhantes aos da HCL. As células neoplásicas têm citoplasma semelhante às da HCL, mas apresentam um nucléolo vesicular proeminente, similar ao dos pró-linfócitos (Figura 9.65).

Diagnóstico diferencial

É feito com HCL e com LELV. Neste, as células neoplásicas apresentam citoplasma menos abundante, e o nucléolo, quando visível, é menos proeminente do que na variante da HCL.

Exames adicionais

Utilizam-se o imunofenótipo, a citoquímica e a biópsia da medula para confirmar o diagnóstico. Os imunofenótipos da forma variante e da HCL diferem, e a atividade TRAP costuma ser negativa na

variante. A biópsia da medula não mostra as células espaçadas, invariavelmente observadas na HCL. LELV apresenta um imunofenótipo semelhante ao da variante da HCL, de modo que a diferenciação é feita principalmente pelos aspectos citológicos e histológicos.

Linfoma esplênico com linfócitos vilosos (LELV) (linfoma esplênico da zona marginal)

Os aspectos clínicos do LELV são esplenomegalia proeminente, com linfonodomegalias discretas ou ausentes. Na classificação da OMS, é considerado como variante do linfoma esplênico da zona marginal.

Hemograma

A contagem de leucócitos varia de normal a moderadamente elevada. A distensão sanguínea (Figura 9.66) mostra um número variável de pequenos linfócitos maduros, de aparência não tão uniforme como os da LLC. O núcleo é redondo com grumos de cromatina, às vezes com um nucléolo pouco nítido. A extensão do citoplasma é de escassa a moderada e a basofilia, de fraca a moderada. Algumas das células neoplásicas apresentam margens irregulares ou “vilosas”, às vezes em um dos polos da célula. Em alguns casos, as células linfomatosas não mostram aspectos distintivos. Em outros, as células neoplásicas mostram diferenciação plasmocitoide. Pode haver exagero na formação de *rouleaux* devido à presença de uma paraproteína.

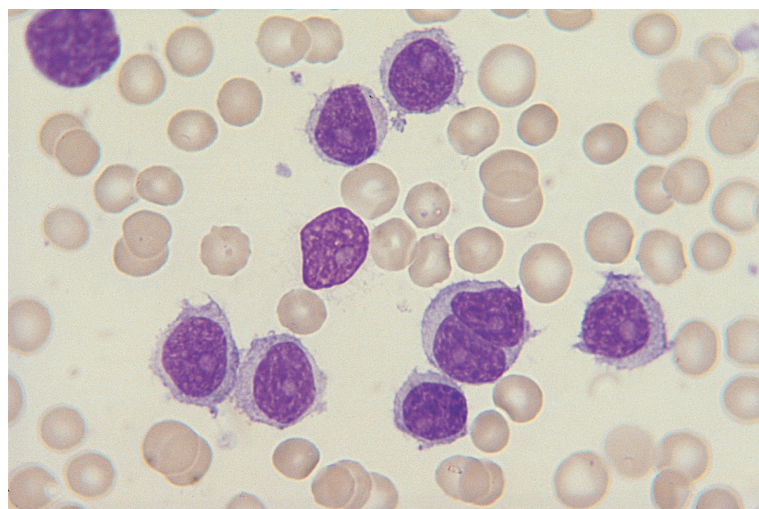


FIGURA 9.65 Distensão sanguínea da forma variante da *hairy cell leukaemia*, mostrando células com as mesmas características citoplasmáticas, mas com nucléolo proeminente. Observa-se uma célula binucleada. Cortesia do Professor Daniel Catovsky.

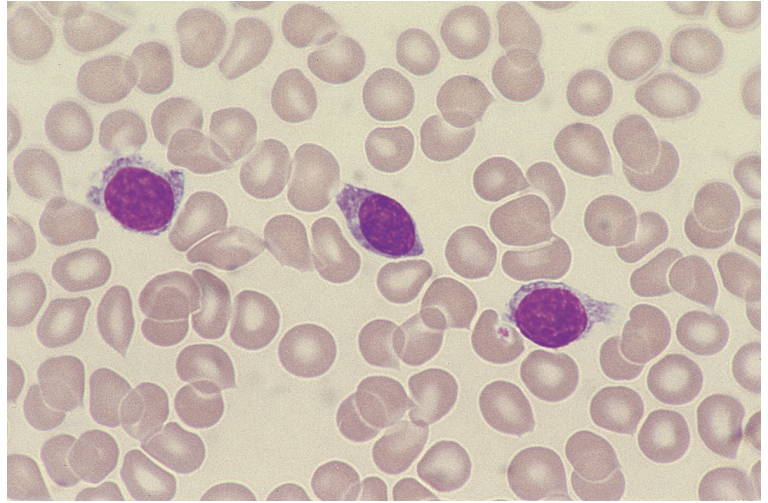


FIGURA 9.66 Distensão sanguínea em linfoma esplênico com linfócitos vilosos.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com a LLC e com a forma variante da HCL.

Exames adicionais

A imunofenotipagem é útil para distinguir LELV de LLC (ver Tabela 9.15). A eletroforese do soro pode identificar a presença de uma paraproteína.

Linfoma linfoplasmocítico

Segundo a definição da OMS, é um linfoma no qual algumas células mostram uma diferenciação para plasmócitos; foi chamado anteriormente de linfoma linfoplasmocitoide. É uma doença dos linfonodos, algumas vezes do baço e de outros órgãos linfoides. Alguns casos apresentam envolvimento do sangue periférico e da medula óssea. Ocorre frequentemente a secreção de uma paraproteína, em geral IgM. Algumas vezes, a paraproteína é uma crioglobulina ou mostra atividade de crioaglutinina. O termo “macroglobulinemia de Waldenström” tem sido usado como sinônimo de linfoma linfoplasmocítico, mas na verdade o que Waldenström descreveu foi um linfoma linfoplasmocítico com um pico considerável de IgM sérica, causando síndrome de hiperviscosidade.

Hemograma

Quando a medula está infiltrada, pode haver anemia normocrômica e normocítica e outras citopenias. A distensão sanguínea pode mostrar apenas *rouleaux* e coloração de fundo pela paraproteína ou

podem ser vistas células linfomatosas circulando (Figura 9.67). Em uma minoria de casos, há aglutinação dos eritrócitos ou deposição de crioglobulina. As células linfomatosas circulantes assemelham-se a linfócitos pequenos, mas têm alguns aspectos plasmocitoides, como basofilia citoplasmática e núcleo excêntrico. Para completar os critérios diagnósticos da OMS, alguns plasmócitos maduros devem estar presentes no sangue periférico ou em outros tecidos. Raras células podem conter cristais ou inclusões globosas.

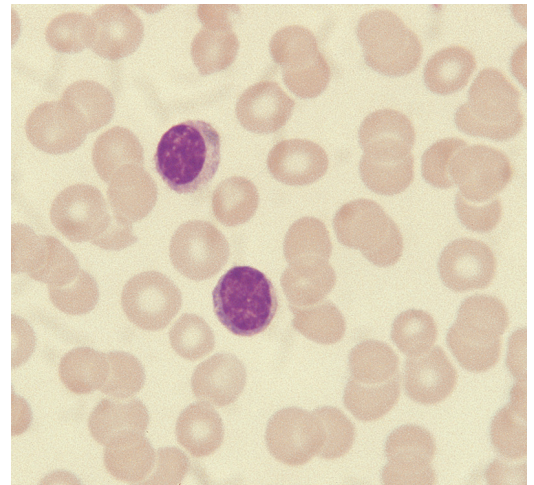


FIGURA 9.67 Distensão sanguínea de linfoma linfoplasmocítico.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com LLC e com LELV. A macroglobulinemia de Waldenström (como descrita por ele) e a doença de crioglobulinas são variantes do linfoma linfoplasmocítico; nestas, os sintomas e sinais predominantes decorrem do pico de IgM que causa, respectivamente, síndrome de hiperviscosidade ou crioprecipitação. Na doença de crioglobulinas, o linfoma em geral é de muito baixo grau de malignidade e clinicamente inaparente. As crioglobulinemias tipos I e II também são neoplasias linfoides; nestas, a paraproteína é uma crioglobulina (tipo I) ou tem atividade de fator reumatoide, complexando-se com imunoglobulina policlonal para formar uma crioglobulina (tipo II). Muitos pacientes com crioglobulinemia tipo II têm hepatite C crônica. Na crioglobulinemia, o clone neoplásico pode estar oculto, tornando-se clinicamente aparente durante o curso da doença. O diagnóstico dessas três condições depende de avaliação do conjunto de aspectos, não apenas das alterações do sangue periférico.

Exames adicionais

São indicadas aspiração e biópsia da medula óssea, imunofenotipagem e pesquisas de paraproteínas séricas e proteína de Bence-Jones urinária (cadeias leves livres de imunoglobulina monoclonal). O imunofenótipo é semelhante ao dos demais linfomas, mas também, pode haver expressão de imunoglobulina citoplasmática e de CD38.

Linfoma folicular

Linfoma folicular ou linfoma centroblástico/centrocítico é uma doença principalmente dos linfonodos, embora na doença avançada também sejam afetados o fígado e o baço. Podem ser observadas células neoplásicas circulantes já ao diagnóstico ou pode desenvolver-se uma fase leucêmica com a progressão da doença.

Hemograma

A contagem de leucócitos varia de normal a muito elevada. A Hb e a contagem de plaquetas podem ser normais, mas, na doença avançada, costumam desenvolver-se anemia e trombocitopenia. Células linfomatosas circulantes podem ser raras ou numerosas. São em geral pequenas (Figura 9.68), com citoplasma escasso, quase inaparente, fracamente basófilo. Alguns núcleos apresentam chanfraduras ou fendas profundas e estreitas (linfócitos clivados). Esses aspectos citológicos são mais aparentes nos casos com leucocitose elevada. Outros casos

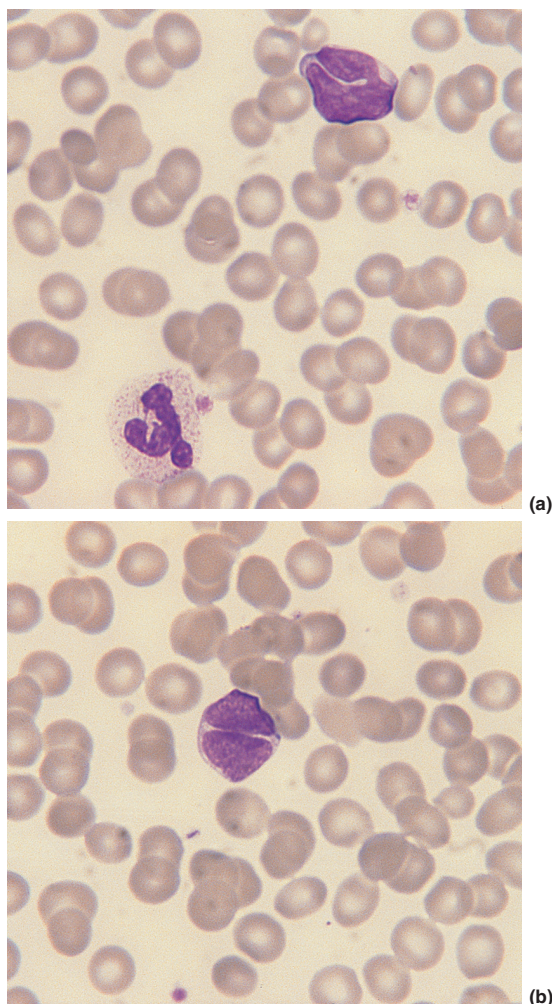


FIGURA 9.68 Distensão sanguínea de linfoma folicular (centroblástico/centrocítico), mostrando: (a) um neutrófilo e um linfócito clivado; e (b) um linfócito clivado.

apresentam células maiores e mais pleomórficas, algumas com nucléolos pequenos, mas distintos; nesses casos, também são observadas chanfraduras ou fendas em certa porcentagem de células. Células amassadas não fazem parte do quadro. Raramente, as células contêm cristais [125].

Diagnóstico diferencial

É feito com LLC e outros linfomas, em particular linfoma de células do manto.

Exames adicionais

A imunofenotipagem é muito útil para estabelecer a distinção entre linfoma folicular e LLC. Os imunofenótipos do linfoma folicular e do linfoma de

células do manto são semelhantes, mas este é CD5-positivo, e o linfoma folicular, CD5-negativo e é muito mais provável que seja CD10-positivo (ver Tabela 9.15). Quando não forem suficientes os aspectos citológicos para fazer o diagnóstico, tornam-se necessárias biópsia de linfonodo e análise citogenética/molecular.

Linfoma de células do manto

O linfoma de células do manto, antes designado linfoma centrocítico difuso e linfoma de diferenciação intermediária, é uma doença principalmente dos linfonodos, mas em um quinto a um quarto dos casos há envolvimento do sangue periférico.

Hemograma

As células linfomatosas são pequenas a médias (Figura 9.69). Alguns casos podem ser confundidos com LLC, mas geralmente as células são mais pleomórficas, variando tanto no formato quanto na relação nucleo-citoplasmática. Algumas apresentam núcleos clivados ou irregulares. A condensação de cromatina é menor do que na LLC e algumas células parecem blastos. Algumas células são nucleoladas. Na variante blastoide, a maioria das células assemelha-se a blastos.

Diagnóstico diferencial

É feito com outros linfomas, com LLC e LLC/LPL. Na variante blastoide deve, ser feito diagnóstico diferencial também com a LLA.

Exames adicionais

O imunofenótipo é muito diferente do da LLC e sutilmente diferente dos demais linfomas (ver Tabela 9.15). Em geral, os aspectos citológicos e imunofenotípicos não são suficientemente distintivos para um diagnóstico definitivo; exame histopatológico de linfonodo ou análise citogenética/molecular são necessários para confirmá-lo. O linfoma caracteriza-se por t(11;14)(q13;q32) (detectável por análise FISH), rearranjo do oncogene *BCL1* e expressão de ciclina D1 (detectável por imunohistoquímica e citometria em fluxo).

Outros linfomas de linhagem B

O linfoma de Burkitt pode invadir o sangue periférico. No linfoma de Burkitt endêmico, a leucemização geralmente ocorre apenas na doença avançada. No linfoma de Burkitt não endêmico e no associado à aids, o envolvimento do sangue periférico é muito mais comum. Quando ocorre uma fase leucêmica, as células são citologicamente idênticas às do grupo FAB "LLA L3".

Nos linfomas de grandes células de linhagem B, a leucemização é muito menos frequente do que nos distúrbios linfoproliferativos de baixo grau de malignidade, descritos anteriormente. Quando vistas no sangue, as células têm diâmetro cerca de três vezes maior do que o dos eritrócitos (Figura 9.70). São pleomórficas, com citoplasma abundante, moderadamente basófilo [126]; os núcleos são frequentemente lobulados com nucléolos

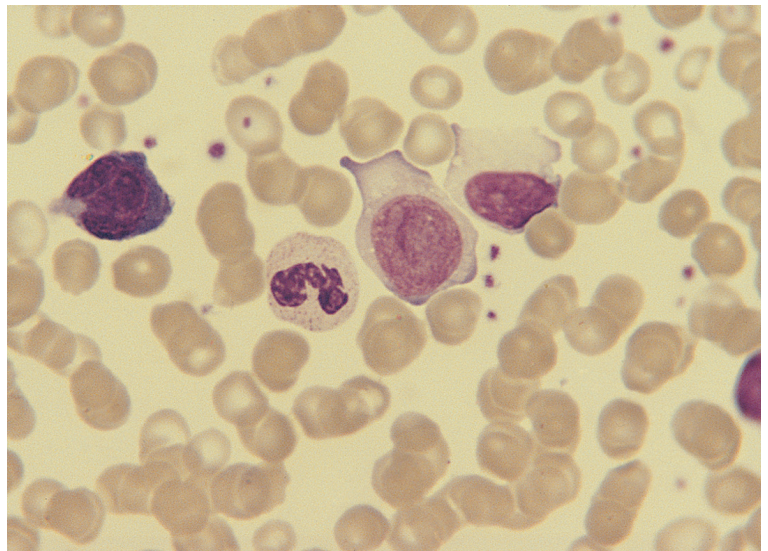


FIGURA 9.69 Distensão de sangue periférico de paciente com linfoma de células do manto, mostrando um neutrófilo e três linfócitos muito pleomórficos. Cortesia da Dra. Estella Matutes, Barcelona.

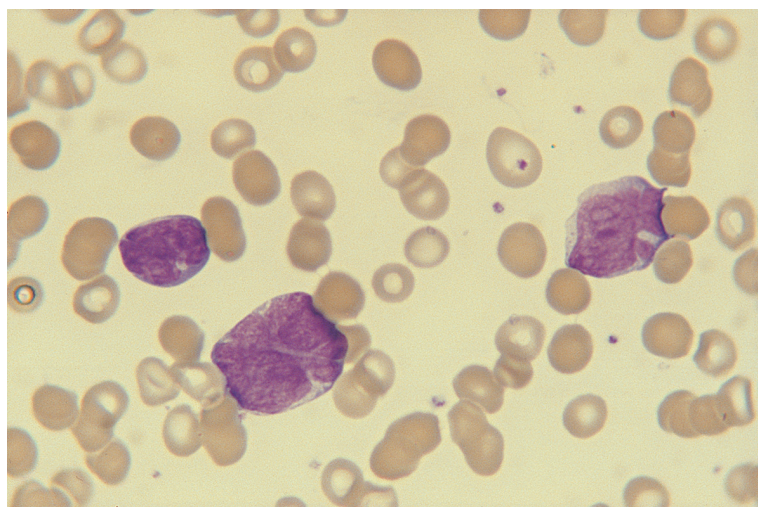


FIGURA 9.70 Distensão sanguínea de linfoma de células grandes (centroblástico), mostrando células linfomatosas pleomórficas com núcleos clivados.

proeminentes. Em alguns casos, as células assemelham-se a monoblastos. Foi descrito um caso de linfoma B de células grandes intravascular cujo diagnóstico decorreu da observação de conglomerados de células linfomatosas em uma distensão sanguínea [127].

Certos linfomas de baixo grau, como o linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e o linfoma monocitoide de células B, muito raramente apresentam uma fase leucêmica, embora possam disseminar-se por via hematogênica. No linfoma monocitoide de células B, as células neoplásicas circulantes podem ter citoplasma volumoso e núcleos irregulares [18].

Os aspectos hematológicos da doença de cadeias pesadas μ são similares aos da LLC, incluindo a presença de restos celulares amassados [128].

Mieloma múltiplo e leucemia plasmocítica

São neoplasias plasmocíticas disseminadas. O mieloma múltiplo, ou mieloma plasmocítico, é caracterizado pela proliferação de plasmócitos anormais (células mielomatosas) na medula óssea e, na grande maioria dos pacientes, pela secreção de imunoglobulina ou cadeia leve monoclonais, referidas como uma paraproteína. A imunoglobulina monoclonal é detectada no soro; a cadeia leve monoclonal, como tem baixo peso molecular, é excretada pela urina, em que é denominada proteína de Bence-Jones. No mieloma múltiplo, algumas células mielomatosas podem liberar-se da medula e aparecer no sangue periférico.

O termo “leucemia plasmocítica” indica que plasmócitos neoplásicos estão circulando no sangue

em número significativo. A leucemia plasmocítica pode ocorrer *de novo* ou como fase terminal do mieloma múltiplo. O grupo FAB [115] sugeriu que esse termo se restringisse à manifestação *de novo* da fase leucêmica, mas outros (inclusive o grupo de especialistas da OMS) usam-no de forma mais ampla [129, 130]. Para o diagnóstico de leucemia plasmocítica, definiu-se arbitrariamente haver uma contagem absoluta de plasmócitos superior a $2 \times 10^3/\mu\text{L}$, com plasmócitos também em porcentagem superior a 20% dos leucócitos do sangue periférico [129]. Na classificação de 2008 da OMS, basta um desses critérios para definir o diagnóstico [130]. A leucemia plasmocítica é particularmente frequente no mieloma com paraproteína IgD.

Também pode ocorrer um quadro transiente de leucemia plasmocítica no decurso de infecção em paciente com mieloma múltiplo, devido, provavelmente, ao estímulo das células mielomatosas pela IL-6 [131].

Os aspectos clínicos mais típicos do mieloma múltiplo são anemia, dores ósseas, hipercalcemia e insuficiência renal.

Hemograma

O hemograma no mieloma múltiplo em geral mostra anemia normocítica e normocrômica, mas a anemia pode ser macrocítica. Na maioria dos casos em que há uma paraproteína sérica, também há aumento da coloração de fundo e da formação de *rouleaux* (Figura 9.71). Casos com proteína de Bence-Jones, mas sem paraproteína sérica, não apresentam aumento de *rouleaux* nem coloração de fundo, de modo que a ausência desses aspectos

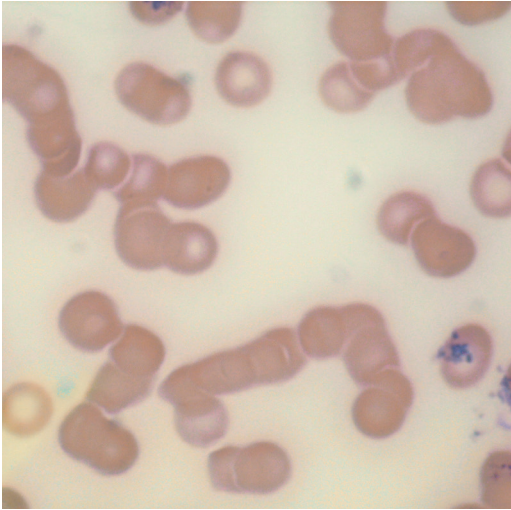


FIGURA 9.71 Distensão sanguínea em mieloma múltiplo, mostrando exagero na formação de *rouleaux*.

não exclui o diagnóstico. As contagens de leucócitos e de plaquetas geralmente não estão elevadas e podem estar reduzidas. Às vezes, são vistos eritroblastos e granulócitos imaturos. As células mielomatosas circulantes podem estar ausentes, ser raras ou até ser numerosas. As células mielomatosas podem ser citologicamente normais, mas com frequência apresentam anormalidades, como imaturidade nuclear (padrão de cromatina difuso e nucléolo), relação nucleo-citoplasmática elevada, redução da basofilia citoplasmática e zona de Golgi maldesenvolvida, figuras mitóticas, binuclearidade e assincronia de maturação nucleo-citoplasmática.

O número de plasmócitos circulantes tem implicações prognósticas: quando acima de 4%, é indicativo de pior prognóstico [132].

Na leucemia plasmocítica (Figura 9.72), as células neoplásicas podem parecer plasmócitos maduros ou, em particular nos casos com apresentação *de novo*, podem ser grosseiramente anormais, com padrão de cromatina imaturo, nucléolos e mínimos aspectos de diferenciação plasmocítica.

Em alguns pacientes com mieloma múltiplo, a paraproteína é uma crioglobulina ou tem atividade de crioglobulina. Nesses casos, crioglobulina precipitada ou aglutinados de eritrócitos podem ser vistos nas distensões sanguíneas. Crioglobulinas e crioglobulinas costumam causar resultados espúrios nos contadores automatizados de células (ver Capítulo 4).

Diagnóstico diferencial

Em pacientes com células mielomatosas circulantes, o diagnóstico diferencial deve ser feito com a plasmocitose reacional. Ambas as condições podem apresentar aumento de *rouleaux* e da coloração de fundo, mas essas anormalidades são geralmente muito mais nítidas no mieloma múltiplo. Em pacientes com plasmocitose reacional, frequentemente há neutrofilia, monocitose, trombocitose e alterações dos neutrófilos, raras no mieloma múltiplo. Há, entretanto, uma rara reação leucemoide neutrófila algumas vezes descrita no mieloma múltiplo. Anormalidades citológicas acentuadas indicam uma condição neoplásica.

O diagnóstico diferencial dos casos sem plasmócitos circulantes é feito com as demais causas de

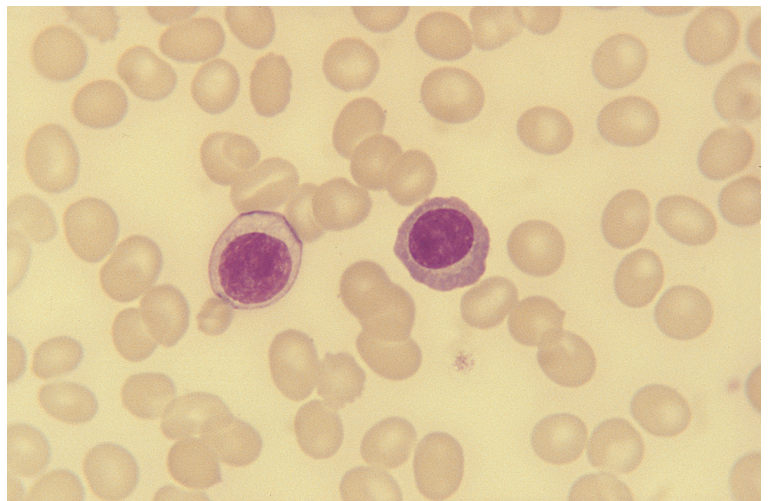


FIGURA 9.72 Distensão de sangue periférico de paciente com leucemia plasmocítica, mostrando dois plasmócitos neoplásicos.

anemia normocítica e normocrômica, particularmente condições como aids, inflamações crônicas e cirrose, em que há um aumento policlonal de proteínas plasmáticas com formação de *rouleaux*.

Quando as células neoplásicas são citologicamente muito atípicas, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com leucemia prolinfocítica e linfomas.

Exames adicionais

A VSG está geralmente muito elevada no mieloma múltiplo; às vezes, é usada como teste de triagem para essa condição. Deve-se notar, entretanto, que a VSG pode ser normal se houver hiperviscosidade acentuada e que, nos casos sem paraproteína sérica, não há elevação acentuada. Quando há suspeita de mieloma múltiplo, os testes indicados para confirmar o diagnóstico são aspiração da medula óssea (mielograma com imunofenotipagem), revisão radiológica do esqueleto, dosagem de cálcio e creatinina séricos e investigação de paraproteínas séricas e urinárias. Testes para paraproteínas incluem eletroforese e imunofixação de proteínas séricas, imunofixação de urina concentrada e nefelometria para estabelecer a proporção entre cadeias κ e λ livres no soro; esta última técnica detectará uma anormalidade em pacientes com mieloma de Bence-Jones e na maioria de pacientes com mieloma não secretor [133]. A imunofenotipagem não é necessária, a menos que haja algum motivo de dúvida sobre a condição neoplásica dos plasmócitos; nesse caso, o uso de reagentes anti- κ e anti- λ servirá para demonstrar clonalidade. A imunofenotipagem de células do sangue também pode ser usada para identificar

pequeno número de plasmócitos clonais, um indicador de pior prognóstico [134]. Também se utiliza a imunofenotipagem quando há dúvidas sobre se células circulantes, altamente anormais, são neoplásicas, ou quando sua linhagem não for evidente. O imunofenótipo do plasmócito terminalmente diferenciado é distinto do fenótipo de todas as células linfomatosas (ver Tabela 9.15).

Distúrbios linfoproliferativos de linhagem T

Distúrbios linfoproliferativos de linhagem T são menos comuns do que os de linhagem B. O diagnóstico preciso exige imunofenotipagem e, algumas vezes, análise citogenética ou exame histopatológico de linfonodos, de pele ou de outros tecidos.

Leucemia prolinfocítica de linhagem T (T-LPL)

T-LPL em geral é uma doença de pessoas idosas. O aspecto clínico mais frequente é a esplenomegalia. Às vezes, está presente um exantema indicativo de infiltração cutânea.

Hemograma

A contagem de leucócitos é moderada a acentuadamente aumentada. Os prolinfócitos de linhagem T (Figura 9.73) são menores e mais pleomórficos do que os de linhagem B. Os núcleos são irregulares ou lobulados. O citoplasma é em geral escasso,

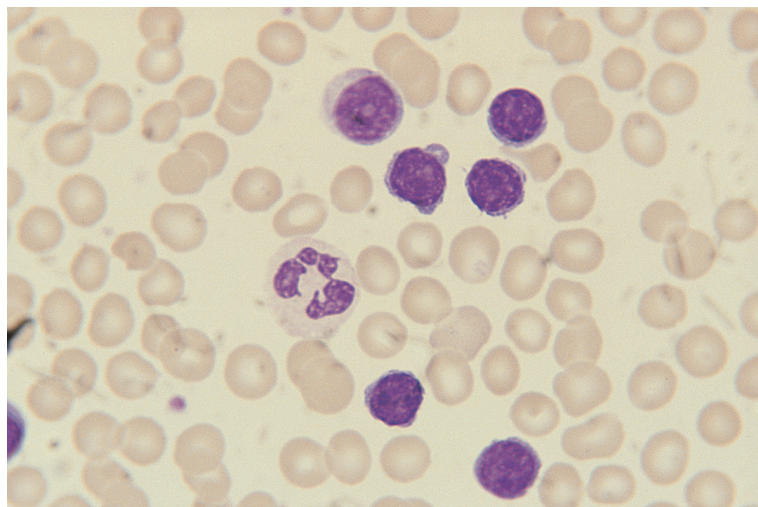


FIGURA 9.73 Distensão de sangue periférico de paciente com LPL de linhagem T mostrando linfócitos com núcleos irregulares hiper cromáticos, nucléolos pouco evidentes e citoplasma escasso, moderadamente basófilo, que forma bolhas em uma das células. Apenas uma das células assemelha-se às da LPL de linhagem B, sendo maior, com mais citoplasma e nucléolo mais proeminente.

podendo ser levemente basófilo. Em alguns casos, as células apresentam protruções citoplasmáticas (*blebs*). Os nucléolos podem ser inaparentes ou proeminentes, mas raramente tão grandes ou proeminentes como na B-LPL.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é feito principalmente com a LLC e a B-LPL.

Exames adicionais

A imunofenotipagem é essencial para confirmar o diagnóstico. As células caracteristicamente expressam CD7, em geral negativo nos demais distúrbios linfoproliferativos de linhagem T (ver Tabela 9.16).

Linfomas cutâneos de células T

Micose fungoide e síndrome de Sézary são linfomas de células T que possuem a característica de se infiltrar na pele. O diagnóstico de síndrome de Sézary exige a presença de células linfomatosas circulantes e disseminação da doença já ao diagnóstico; na micose fungoide, células circulantes só são observadas nos casos de doença avançada. Os aspectos citológicos da síndrome de Sézary e da micose fungoide são similares, embora apresentem grande variação de caso a caso.

Hemograma

O hemograma pode ser normal ou mostrar linfocitose à custa dos linfócitos neoplásicos. Às vezes,

há também cosinofilia. As células linfomatosas, conhecidas como células de Sézary, podem ser predominantemente pequenas (Figura 9.74) ou grandes (Figura 9.75) ou um mesmo caso pode apresentar mistura de células grandes e pequenas. O aspecto mais característico da célula de Sézary é o núcleo convoluto ou cerebriforme, com lobos nucleares intimamente entrelaçados. O citoplasma é fracamente basófilo, podendo conter um anel de vacúolos semelhante às contas de um rosário. Nas células de Sézary pequenas, o citoplasma é escasso; o núcleo é compacto, e a superfície parece sulcada. Nas células de Sézary grandes, há mais citoplasma e o núcleo é maior, com lobos mais evidentes. O número absoluto de células de Sézary circulantes tem significância prognóstica.

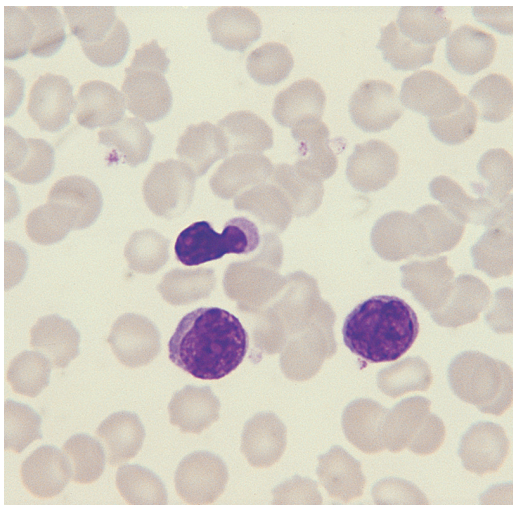
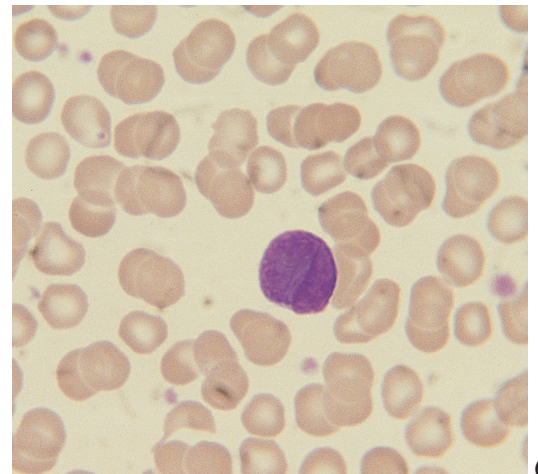
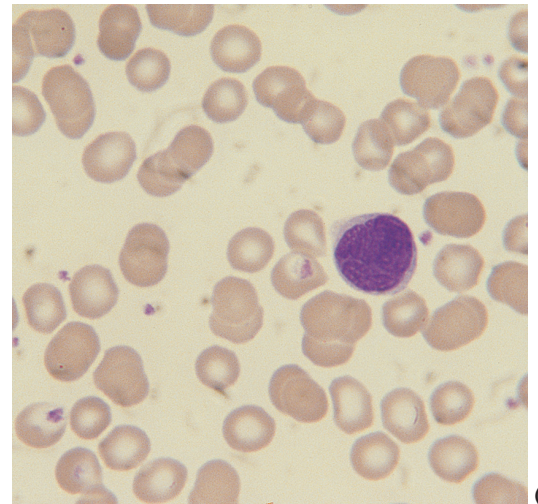


FIGURA 9.74 Distensão sanguínea de síndrome de Sézary; mostrando células de Sézary pequenas com núcleos hiper-cromáticos convolutos ou cerebriformes.



(a)



(b)

FIGURA 9.75 Distensão sanguínea de síndrome de Sézary, mostrando células de Sézary grandes.

Diagnóstico diferencial

Deve ser feito com os outros linfomas e com dermatopatias benignas em que, às vezes, células parecidas são vistas no sangue [135]. “Leucemia de células de Sézary”, sem a infiltração cutânea da síndrome, é aceita atualmente como uma variante de T-LPL.

Exames adicionais

Utilizam-se, para o diagnóstico, a biópsia de lesões cutâneas e a imunofenotipagem (ver Tabela 9.16). São característicos os acúmulos intraepidérmicos de linfócitos (microabscessos de Pautrier). Algumas vezes, é difícil identificar células de Sézary pequenas à microscopia óptica; nesses casos, pode-se fazer exame ultraestrutural, com o qual é fácil a identificação da complexa forma nuclear (ver Figura 7.18). Como podem ser vistas células semelhantes às de Sézary em condições inflamatórias benignas da pele, a morfologia isolada às vezes é insuficiente para um diagnóstico; demonstração de uma população T clonal é necessária à confirmação.

Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA)*

É uma doença que se desenvolve em pequena porcentagem de adultos portadores de longa data do retrovírus HTLV-1. Esses indivíduos geralmente vivem no Japão e no Caribe, ou originam-se, mas a doença também é encontrada em Taiwan, no Oriente Médio, nas Áfricas Central e Ocidental, na América do Sul, no sudoeste dos Estados Unidos e

em nativos da América do Norte. Na maioria dos casos, a doença manifesta-se como uma leucemia; em uma minoria, como um linfoma. Nos casos em que se manifesta como leucemia, geralmente há linfonodomegalias e, algumas vezes, hepatomegalia e esplenomegalia. Infiltração cutânea e hipercalcemia são frequentes. Pacientes com LLTA também têm suscetibilidade a infecções oportunista.

Hemograma

Frequentemente, a contagem de leucócitos está muito elevada. As células leucêmicas são grandes e muito pleomórficas. Muitos núcleos são multilobulados, com formato semelhante a uma flor ou folha de trevo (Figura 9.76). Alguns núcleos têm a cromatina condensada, outros, padrão difuso de cromatina. Algumas células são nucleoladas. Há uma quantidade variável de citoplasma, geralmente basófilo. Uma minoria de células assemelha-se às da síndrome de Sézary. Alguns pacientes têm eosinofilia associada. Anemia e trombocitopenia podem ser mínimas ao diagnóstico.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é feito com o linfoma cutâneo de células T e com outros linfomas de células T maduras. Ele é feito pelo grau de pleomorfismo e pela presença de pelo menos um pequeno número de células com núcleo em trevo. Também se deve distinguir a forma aguda típica de LLTA da LLTA crônica; nesta, geralmente não há organomegalias, citopenia e anormalidades bioquímicas. Também deve ser distinguida do estado de portador do HTLV-1, no qual pode ocorrer a presença, no sangue periférico, de um pequeno número de

*N. de T. Acrônimo internacional de *Adult T-cell Leukaemia/Lymphoma*.

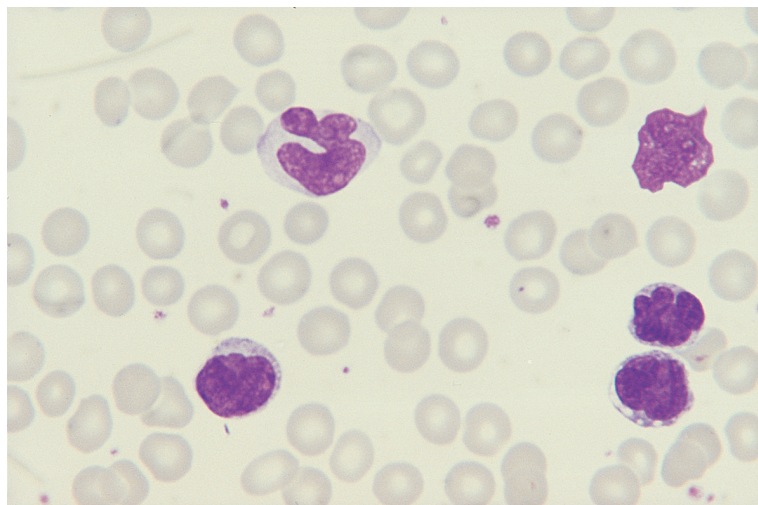


FIGURA 9.76 Distensão sanguínea de leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA), mostrando quatro linfócitos pleomórficos e uma célula amassada; uma das células linfomatosas apresenta núcleo em trevo, e duas outras, núcleos convolutos.

linfócitos policlonais atípicos, alguns com núcleo polilobulado.

Exames adicionais

São indicados testes sorológicos para HTLV-1; não se pode esquecer que um paciente soropositivo pode desenvolver outros tipos de linfoma e de leucemia linfoide. A imunofenotipagem também é útil no diagnóstico diferencial, pois CD25 em geral é positivo, e costuma ser negativo em outras leucemias e linfomas de células T fenotipicamente maduras (ver Tabela 9.16).

Leucemia de linfócitos grandes e granulares

Leucemia de linfócitos grandes e granulares constitui um grupo heterogêneo de distúrbios, no qual as células neoplásicas apresentam aspectos citológicos de linfócitos grandes e granulares e aspectos imunofenotípicos de células T citotóxicas ou de células *natural killer* (NK). A evolução clínica é variável. Alguns pacientes apresentam pouca organomegalia e uma doença lentamente progressiva, mas a evolução pode complicar-se com os efeitos da citopenia, em geral neutropenia. Outros pacientes, particularmente os com células com fenótipo NK, apresentam aspectos mais típicos de linfoma e evolução clínica mais rápida.

Hemograma

Na maioria dos casos, as células leucêmicas são citologicamente iguais aos linfócitos grandes e

granulares normais (Figura 9.77), com núcleo pequeno com cromatina condensada, abundante citoplasma fracamente basófilo e grânulos azurófilos proeminentes em pelo menos algumas das células. Às vezes, são maiores, com irregularidade nuclear e basofilia citoplasmática. Alguns pacientes apresentam neutropenia ou, com menos frequência, anemia ou trombocitopenia. As citopenias podem ser extremas e resultam de respostas imunológicas anormais, em vez de infiltração da medula óssea.

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é feito com um aumento reacional dos linfócitos grandes e granulares, por exemplo, provocado por infecção viral crônica, por esplenectomia prévia ou associado à neutropenia autoimune induzida por rituximabe.

Exames adicionais

Quando houver dúvida quanto ao diagnóstico, imunofenotipagem e testes para demonstrar clonalidade são úteis. As células geralmente expressam CD2 e CD8 e não expressam CD4 (ver Tabela 9.16). Nos casos de linhagem T, há expressão de CD3, antígenos do receptor T e, geralmente, CD57. Casos de linhagem NK não expressam CD3 nem antígenos do receptor T; podem expressar CD11b, CD16 e CD56 e, menos vezes, CD57. Um imunofenótipo muito uniforme é sugestivo de clonalidade e, portanto, de neoplasia. Pode-se demonstrar a clonalidade nos casos CD3-positivos pela análise genético-molecular para demonstrar rearranjo dos genes receptores da célula T. Nos casos CD3-negativos, a análise citogenética algumas vezes demonstra um clone anormal. Em um grupo mais amplo, a análise da expressão de CD158a, CD158b e CD158e (*killer inhibitory ryreceptor*) fornece evidência de clonalidade [136]. Células NK policlonais expressam todos os três antígenos, enquanto células NK monoclonais expressam apenas um ou nenhum deles.

Outros linfomas de células T

Linfomas de células T são menos frequentes do que linfomas de células B e têm uma fase leucêmica com menor frequência.

Hemograma

As células linfomatosas circulantes são em geral de tamanho médio ou grande e muito pleomórficas (Figuras 9.78 e 9.79).

Diagnóstico diferencial

Apenas pela morfologia, não se pode distinguir com confiança entre linfomas de células T e certos

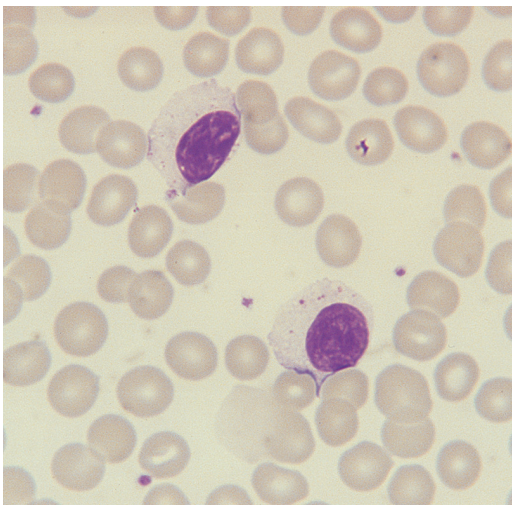


FIGURA 9.77 Distensão sanguínea de leucemia de linfócitos grandes e granulares, mostrando dois linfócitos grandes e granulares.

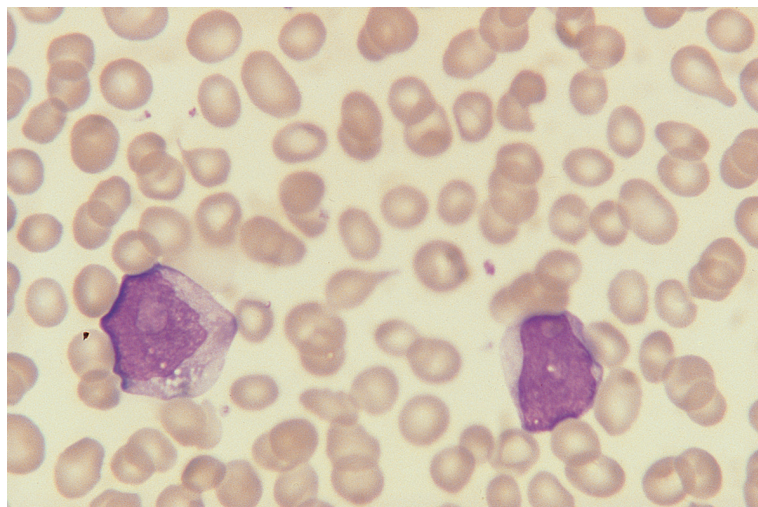


FIGURA 9.78 Distensão sanguínea de linfoma de grandes células de linhagem T, mostrando duas células linfomatosas grandes.

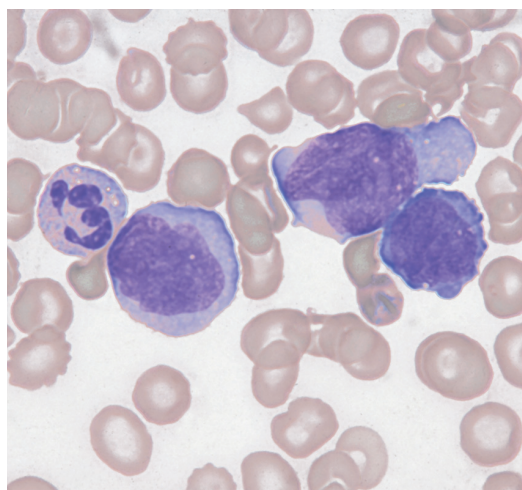


FIGURA 9.79 Distensão sanguínea de linfoma anaplásico de grandes células de linhagem T, mostrando células muito grandes e pleomórficas. Cortesia do Dr. David Clark, Grantham.

linfomas de células B, particularmente do linfoma de células do manto e do linfoma de grandes células de linhagem B. Algumas vezes, também podem ser confundidos com LMA, em particular leucemia monoblástica aguda.

Exames adicionais

Imunofenotipagem é indicada e confirma o diagnóstico: as células expressam marcadores de células T, mas frequentemente o imunofenótipo é aberrante. A análise molecular mostra rearranjo dos genes do receptor de células T.

Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin (antes, doença de Hodgkin) origina-se de linfócitos B. Atualmente, é dividido em duas categorias principais, linfoma de Hodgkin de predominância linfocítica nodular e linfoma de Hodgkin clássico. A primeira é claramente originada de linfócitos B; na doença clássica, as células neoplásicas (células de Reed-Sternberg e células mononucleares de Hodgkin) são células B defeituosas, com falta de expressão de vários antígenos de superfície associados à linhagem B. O linfoma de Hodgkin clássico é subdividido em linfoma de Hodgkin tipo esclerose nodular, linfoma de Hodgkin tipo celularidade mista, linfoma de Hodgkin tipo depleção linfocítica e linfoma de Hodgkin rico em linfócitos, clássico. A apresentação clínica mais comum é de linfonomegalia(s), com ou sem sintomas sistêmicos.

Hemograma

O linfoma de Hodgkin pode causar anemia, leucocitose, neutrofilia, eosinofilia, linfopenia e trombocitose. A anemia costuma ser normocítica e normocrômica, mas pode ser microcítica e hipocrômica, com as características de anemia de doença crônica. Pode haver exagero de *rouleaux* e intensificação da coloração de fundo. Quando há infiltração da medula óssea, pode haver anemia, leucopenia ou pancitopenia. À análise multivariada, leucocitose e linfopenia correlacionam-se com pior prognóstico [137].

Diagnóstico diferencial

Inclui os demais linfomas e uma variedade de condições infecciosas e inflamatórias. Não há aspectos

característicos do hemograma que apontem para o diagnóstico de linfoma de Hodgkin.

Exames adicionais

VSG está aumentada, ferro sérico e capacidade ferropéxica estão diminuídos, ferritina sérica está normal ou elevada. O diagnóstico exige biópsia de linfonodo, embora ocasionalmente possa ser obtido por mielograma e biópsia de medula óssea, especialmente em pacientes com imunodeficiência decorrente de infecção por HIV.

TESTE SEUS CONHECIMENTOS

Visite o *website*, em inglês, com as Questões de Múltipla Escolha (MCQs) e as Questões de Correlação Múltipla (EMQs) deste tópico:

www.wiley.com/go/bain/bloodcells

Senha: idiosyncratic



Referências

- Leibovici L, Drucker M, Samra Z, Konisberger H and Pitlik SD (1995) Prognostic significance of the neutrophil count in immunocompetent patients with bacteraemia. *Q J Med*, **88**, 181–189.
- Gombos MM, Bienkowski RS, Gochman RF and Billett HH (1998) The absolute neutrophil count: is it the best indicator of bacteremia in infants? *Am J Clin Pathol*, **109**, 221–225.
- Lascari AD (1984) *Hematologic Manifestations of Childhood Diseases*. Theme-Stratton, New York.
- Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR and Browne R (1979) The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr*, **95**, 89–98.
- Christensen RD and Rothstein G (1978) Pitfalls in the interpretation of leukocyte counts in newborn infants. *Am J Clin Pathol*, **72**, 609–611.
- Morris CDW, Bird AR and Nell H (1989) The haematological and biochemical changes in severe pulmonary tuberculosis. *Q J Med*, **73**, 1151–1159.
- Glasser RM, Walker RI and Herion JC (1990) The significance of hematologic abnormalities in patients with tuberculosis. *Arch Intern Med*, **125**, 691–695.
- Hoagland RJ (1960) The clinical manifestations of infectious mononucleosis: a report of two hundred cases. *Am J Med*, **240**, 21–29.
- Brigden ML, Au S, Thompson S, Brigden S, Doyle P and Tsaparas Y (1999) Infectious mononucleosis in an outpatient population: diagnostic utility of 2 automated hematology analyzers and the sensitivity and specificity of Hoagland's criteria in heterophile-positive patients. *Arch Path Lab Med*, **123**, 875–881.
- Lach-Szyrma V and Brito-Babapulle F (1999) The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. *Clin Lab Haematol*, **21**, 277–280.
- Kahl C and Freund M (2010) Peripheral blood alterations in a patient with infectious mononucleosis. *Br J Haematol*, **150**, 2.
- Cantow EF and Kostinas JE (1966) Studies on infectious mononucleosis. IV. Changes in the granulocytic series. *Am J Clin Pathol*, **46**, 43–47.
- Habib MA, Babka JC and Burningham RA (1973) Profound granulocytopenia associated with infectious mononucleosis. *Am J Med Sci*, **265**, 339–346.
- Sumaya CV and Ench Y (1985) Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics*, **75**, 1003–1010.
- Carter JW, Edson RS and Kennedy CC (1978) Infectious mononucleosis in the older patient. *Mayo Clin Proc*, **53**, 146–150.
- Bar RS, Adlard J and Thomas FB (1975) Lymphopenic infectious mononucleosis. *Arch Intern Med*, **135**, 334–337.
- Akashi K, Eizuru Y, Sumiyoshi Y, Minematsu T, Hara S, Harada M *et al.* (1993) Severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med*, **329**, 168–171.
- Foucar K (2001) *Bone Marrow Pathology*, 2nd edn, ASCP Press, Chicago.
- Piankijagum A, Visudhiphan S, Aswapokee P, Suwanagool S, Kruatrachue M and Na-Nakorn S (1977) Hematological changes in typhoid fever. *J Med Assoc Thai*, **60**, 828–838.
- McDonald JC, MacLean JD and McDade JE (1988) Imported rickettsial disease: clinical and epidemiologic features. *Am J Med*, **85**, 799–805.
- Wilson ME, Brush AD and Meany MC (1989) Murine typhus acquired during short-term urban travel. *Am J Med*, **57**, 233–234.
- McDade JE (1990) Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. *J Infect Dis*, **161**, 609–617.
- Chesterman CN (1992) Late adverse effects of streptokinase. *Aust NZ J Med*, **22**, 106–108.
- Cullen MH, Stansfeld AG, Oliver RTD, Lister TA and Malpas JS (1979) Angio-immunoblastic lymphadenopathy: report of ten cases and review of the literature. *Q J Med*, **48**, 151–177.
- Delbarre F, Le Go A and Kahan A (1975) Hyperbaphilic immunoblasts in the circulating blood in chronic inflammatory rheumatic and collagen diseases. *Ann Rheum Dis*, **34**, 422–430.
- Daniele R and Rowlands DT (1976) Lymphocyte subpopulations in sarcoidosis: correlation with disease activity and duration. *Ann Intern Med*, **85**, 593–600.
- Craig J and Isaacs D (1993) Kawasaki syndrome in a Sydney hospital. *Aust NZ J Med*, **23**, 440.
- Karandikar NJ, Kroft SH, Yegappan S, Rogers BB, Aquino VM, Lee KM *et al.* (2004) Unusual immunophenotype of CD8+ T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*, **104**, 2007–2009.
- Nakahara K, Utsunomiya A, Hanada S, Takeshita T, Uozumi K, Yamamoto K *et al.* (1998) Transient appearance of CD3+CD8+ T lymphocytes with

- monoclonal gene rearrangement of T-cell receptor beta locus. *Br J Haematol*, **100**, 411–414.
- 30 Horwitz CA, Henle W, Henle G, Polesky H, Balfour HH, Siem RA *et al.* (1977) Heterophile-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illnesses. *Am J Med*, **63**, 947–957.
 - 31 Tsaparas YF, Brigden M, Mathias R, Thomas E, Raboud J and Doyle PW (2000) Proportion positive for Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6, *Toxoplasma*, and human immunodeficiency virus types 1 and 2 in heterophile-negative patients with an absolute lymphocytosis and an instrument-generated atypical lymphocyte flag. *Arch Pathol Lab Med*, **124**, 1324–1330.
 - 32 Smith PR, Cavenagh JD, Milne T, Howe D, Wilkes SJ, Sinnott P *et al.* (2000) Benign monoclonal expansion of CD8+ lymphocytes in HIV infection. *J Clin Pathol*, **53**, 177–181.
 - 33 Milne TM, Cavenagh JD, Macey MG, Dale C, Howes D, Wilkes S and Newland AC (1998) Large granular lymphocyte (LGL) expansion in 20 HIV infected patients; analysis of immunophenotype and clonality. *Br J Haematol*, **101**, Suppl. 1, 107.
 - 34 Bain BJ (2008) Dysplastic neutrophils in an HIV-positive woman. *Am J Hematol*, **83**, 738.
 - 35 Koster F, Foucar K, Hjelle B, Scott A, Chong Y-Y, Larson R and McCabe M (2001) Rapid presumptive diagnosis of hantavirus cardiopulmonary syndrome by peripheral blood smear review. *Am J Clin Pathol*, **116**, 665–672.
 - 36 Pol S, Thiers V, Driss F, Devergie A, Berthelot P and Bréchet C (1993) Lack of evidence for a role of HCV in hepatitis-associated aplastic anaemia. *Br J Haematol*, **85**, 808–810.
 - 37 Bosch Benitez JM, Piris M, Peri V, Martin L, Marre-ro M, Mollejo M *et al.* (2011) Persistent B cell polyclonal lymphocytosis (PPBL) with massive splenomegaly mimicking marginal zone lymphoma. *Haematologica*, **96**, Suppl. 2, 569.
 - 38 Mossafa H, Malaure H, Maynadie M, Valensi F, Schillinger F, Garand G *et al.* (1999) Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire. *Br J Haematol*, **104**, 486–493.
 - 39 Callet-Bauchu E, Gazzo S, Poncet C, Pages J, Morel D, Alliot C *et al.* (2000) Distinct chromosome 3 abnormalities in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*, **26**, 221–228.
 - 40 Deplano S, Nadel-Melsió E and Bain BJ (2014) Persistent polyclonal B lymphocytosis. *Am J Hematol*, **89**, 224.
 - 41 Lesesve J-F, Cornet E, Mossafa H and Troussard X (2011) EDTA-dependent lymphoagglutination in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*, **154**, 668.
 - 42 Mossafa H, Tapia S, Flandrin G, Troussard X and the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) (2004) Chromosomal instability and the ATR amplification gene in patients with persistent and polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL). *Leuk Lymphoma*, **45**, 1401–1406.
 - 43 Himmelmann A, Gautschi O, Nawrath M, Bolliger U, Fehr J and Stahel RA (2001) Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IGD+CD27+ memory B cells. *Br J Haematol*, **114**, 400–405.
 - 44 Salcedo I, Campos-Caro A, Sampalo A, Reales E and Brieva JA (2002) Persistent polyclonal B lymphocytosis: an expansion of cells showing IgVH gene mutations and phenotypic features of normal lymphocytes with the CD27+ marginal zone B-cell compartment. *Br J Haematol*, **116**, 662–666.
 - 45 Del Giudice I, Pileri SA, Rossi M, Sabattini E, Campidelli C, Starza ID *et al.* (2009) Histopathological and molecular features of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) with progressive splenomegaly. *Br J Haematol*, **144**, 726–731.
 - 46 Leder K and Weller PF (2000) Eosinophilia and helminth infections. *Baillière's Clin Haematol*, **13**, 301–317.
 - 47 Chusid ML, Dale DC, West BC and Wolff SM (1975) The hypereosinophilic syndrome. *Medicine*, **54**, 1–27.
 - 48 Cogan E, Schandené L, Crusiaux A, Cochaux P, Velu T and Goldman M (1994) Clonal proliferation of type 2 helper T cells in a man with the hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*, **330**, 535–538.
 - 49 Simon H-U, Plotz SG, Dummer R and Blaser K (1999) Abnormal clones of T cells producing interleukin-5 in idiopathic eosinophilia. *N Engl J Med*, **341**, 1112–1120.
 - 50 Means-Markwell M, Burgess T, de Keratry D, O'Neil K, Mascola J, Fleisher T and Lucey D (2000) Eosinophilia with aberrant T cells and elevated serum levels of interleukin-2 and interleukin-15. *N Engl J Med*, **342**, 1568–1571.
 - 51 Spry C (1980) Discussion: Management of the idiopathic hypereosinophilic syndrome. In: Mahmoud AAF, Austere KP and Simon AS (eds). *The Eosinophil in Health and Disease*, Grune & Stratton, New York.
 - 52 Parker RI (1991) Hematologic aspects of mastocytosis. II. Management of hematologic disorders in association with systemic mast cell disease. *J Invest Dermatol*, **96**, 52S–53S.
 - 53 Bain B (1991) Down's syndrome—transient abnormal myelopoiesis and acute leukaemia. *Leuk Lymphoma*, **3**, 309–317.
 - 54 Ferrer A, Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Alvarez A and Montserrat E (1999) Leukemoid reaction preceding the diagnosis of colorectal carcinoma by four years. *Haematologica*, **84**, 671–672.
 - 55 Olipitz E, Strunk D, Beham-Schmid C and Sill H (2004) Neutrophilic leukaemoid reactions as the presenting feature of de novo and therapy-related acute leukemias. *Acta Haematologica*, **111**, 233–234.
 - 56 Stevens MCG, Darbyshire PJ and Brown SM (1987) Early congenital syphilis and severe haematological disturbance. *Arch Dis Child*, **62**, 1073–1075.
 - 57 Willoughby MLN (1977) *Paediatric Haematology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
 - 58 Standen GA, Steers FJ and Jones L (1998) Clonality of chronic neutrophilic leukaemia associated with myeloma: analysis using the X-linked probe M27. *J Clin Pathol*, **46**, 297–298.

- 59 Nagai M, Oda S, Iwamoto M, Marumoto K, Fujita M and Takahara J (1996) Granulocyte-colony stimulating factor concentrations in a patient with plasma cell dyscrasia and clinical features of chronic neutrophilic leukaemia. *J Clin Pathol*, **49**, 858–860.
- 60 Kohmura K, Miyakawa Y, Kameyama K, Kizaki M and Ikeda Y (2004) Granulocyte colony stimulating factor-producing multiple myeloma associated with neutrophilia. *Leuk Lymphoma*, **45**, 1475–1479.
- 61 Dinçol G, Nalçaci M, Dogan O, Aktan M, Küçükka-ya R, Agan M and Dinçol K (2002) Coexistence of chronic neutrophilic leukemia with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, **43**, 649–651.
- 62 Marui T, Yamamoto T, Akisue T, Hitora T, Yoshiya S and Kurosaka M (2003) Granulocyte colony-stimulating factor-producing undifferentiated sarcoma occurring in previously fractured femur. *Arch Pathol Lab Med*, **127**, e186–e189.
- 63 Sonobe H, Ohtsuki Y, Ido E, Furihata M, Iwata J, Enzan H *et al.* (1997) Epithelioid sarcoma producing granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Pathol*, **28**, 1433–1435.
- 64 Reykdal S, Sham R, Phatak P and Kouides P (1995) Pseudoleukemia following the use of G-CSF. *Am J Hematol*, **49**, 258–259.
- 65 Pinkel D (1998) Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood*, **91**, 365–367.
- 66 Beigelman A, Moser AM, Shubinsky G, Ben-Harosh M, Alon H, Benjamin G and Kapelushnik J (2003) The leukaemoid reaction – clinical and molecular characterization in the pediatric population. *Blood*, **102**, 53b.
- 67 Herrod HG, Dow LW and Sullivan JL (1983) Persistent Epstein–Barr virus infection mimicking juvenile chronic myelogenous leukemia: immunologic and hematologic studies. *Blood*, **61**, 1098–1104.
- 68 Kirby MA, Weitzman S and Freedman MH (1990) Juvenile chronic myelogenous leukemia: differentiation from infantile cytomegalovirus infection. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **12**, 292–296.
- 69 Lorenzana A, Lyons H, Sawal H, Higgins M, Carri-gan D and Emanuel P (1997) Human herpes virus-6 (HHV-6) infection in an infant mimicking juvenile chronic myelogenous leucemia (JCML). *J Pediatr Hematol Oncol*, **19**, 370.
- 70 Yetgin S, Çetin M, Yenicesu I, Öztaltin F and Uçkan D (2000) Acute parvovirus B19 infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol*, **65**, 276–278.
- 71 Toren A, Neumann Y, Meyer JJ, Mandel M, Schi-by G, Kende G *et al.* (1993) Malignant osteopetrosis manifested as juvenile chronic myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, **10**, 187–189.
- 72 Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Paterakis G, Phisphis M and Stefanoudaki-Sofianatou K (2002) Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Res*, **26**, 597–600.
- 73 Bates I, Bedu-Addo G, Rutherford TR and Bevan DH (1997) Circulating villous lymphocytes—a link between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **91**, 171–174.
- 74 Jabbar A and Siddique T (1998) A case of pseudo-lymphoma leukaemia syndrome following cefixime. *Br J Haematol*, **101**, 209.
- 75 Kikuchi M, Ohsaka A, Chiba Y, Sato M, Muraosa Y and Hoshino H (1999) Bone marrow aplasia with prominent atypical plasmacytic proliferation preceding acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **35**, 213–217.
- 76 Ehrlich GD, Han T, Bettigole R, Merl SA, Lehr B, Tomar RH and Poiesz BJ (1988) Human T lymphotropic virus type I-associated benign transient immature T-cell lymphocytosis. *Am J Hematol*, **27**, 49–55.
- 77 Caldwell CW, Poje E and Cooperstock M (1991) Expansion of immature thymic precursor cells in peripheral blood after acute bone marrow suppression. *Am J Clin Pathol*, **95**, 824–827.
- 78 Zeidler C (2005) Congenital neutropenia. *Hematology*, **10**, Suppl. 1, 306–311.
- 79 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (eds) (2008) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
- 80 Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H and Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias (FAB cooperative group). *Br J Haematol*, **33**, 451–459.
- 81 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H and Sultan C (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med*, **103**, 620–625.
- 82 Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H and Sultan C (1985) Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): a report of the French–American–British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, **103**, 460–462.
- 83 Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H and Sultan C (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML M0). *Br J Haematol*, **78**, 325–329.
- 84 Bain BJ (2010) *Leukaemia Diagnosis*, 4th edn, Wiley-Blackwell, Oxford.
- 85 Vardiman J, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A *et al.* (2008) Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: SwerdlowSH, CampoE, HarrisNL, JaffeES, PileriSA, SteinH *et al.* (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
- 86 Lichtman MA and Segel BG (2005) Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic, and myeloid dendritic cell subtypes: a review. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 370–383.
- 87 Soler J, O'Brien M, Tavaras de CJ, San Miguel JF, Kearney L, Goldman JM and Catovsky D (1985)

- Blast crisis of chronic granulocytic leukemia with mast cell and basophil precursors. *Am J Clin Pathol*, **83**, 254–259.
- 88 Coser P, Quaglini D, de Pasquale A, Colombetti V and Prineth O (1980) Cytobiological and clinical aspects of tissue mast cell leukaemia. *Br J Haematol*, **45**, 5–12.
 - 89 Efrati P, Klajman A and Spitz H (1957) Mast cell leukemia? Malignant mastocytosis with leukemia-like manifestations. *Blood*, **12**, 869–882.
 - 90 Parwaresch MR (1976) *The Human Blood Basophil. Morphology, Origin, Kinetics, Function and Pathology*. Springer- Verlag, Berlin.
 - 91 Bain BJ (1994) Transient leukaemia in newborn infants with Down's syndrome. *Leuk Res*, **18**, 723–724.
 - 92 Hitzler JK, Cheung J, Yue LI, Scherer SW and Zipursky A (2003) GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*, **101**, 4301–4304.
 - 93 Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I et al. (2008) Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 94 Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M et al.; International Working Group on Morphology of MDS (IWGM-MDS) (2014) Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, **38**, 447–453.
 - 95 Spiers ASD, Bain BJ and Turner JE (1977) The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia chromosome-positive cases. *Scand J Haematol*, **18**, 25–38.
 - 96 Srodes CH, Hyde EH and Boggs DR (1973) Autonomous erythropoiesis during erythroblastic crisis of chronic myelocytic leukaemia. *J Clin Invest*, **52**, 512–515.
 - 97 Ondreyco SM, Kjeldsberg CR, Fineman RM, Vaninetti S and Kushner JP (1981) Monoblastic transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, **48**, 957–963.
 - 98 Rosenthal S, Schwartz JKH and Canellos GP (1977) Basophilic chronic granulocytic leukaemia with hyperhistaminaemia. *Br J Haematol*, **36**, 367–372.
 - 99 Marinone G, Rossi G and Verzura P (1983) Eosinophilic blast crisis in a case of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **55**, 251–256.
 - 100 Hogge DE, Misawa S, Schiffer CA and Testa JR (1984) Promyelocytic blast crisis in chronic granulocytic leukaemia with 15;17 translocation. *Leuk Res*, **8**, 1019–1023.
 - 101 You W and Weisbrot IM (1984) Chronic neutrophilic leukemia, report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*, **72**, 233–242.
 - 102 Kanoh T, Saigo K and Yamagishi M (1986) Neutrophils with ring-shaped nuclei in chronic neutrophilic leukemia. *Am J Clin Pathol*, **86**, 748–751.
 - 103 Zoumbos NC, Symeonidis A and Kourakli-Symeonidis A (1989) Chronic neutrophilic leukemia with dysplastic features: a new variant of myelodysplastic syndromes? *Acta Haematol*, **82**, 156–160.
 - 104 Bain B, Vardiman JW, Brunning RD and Thiele J (2008) Chronic neutrophilic leukaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 105 Bain BJ, Gilliland DG, Vardiman JW, Brunning RD and Horny H-P (2008) Chronic eosinophilic leukaemia, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon, 2008.
 - 106 Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J et al. (2003) A tyrosine kinase created by the fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*, **348**, 1201–1214.
 - 107 Bain BJ, Gilliland DG, Horny H-P and Vardiman JW (2008) Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFA*, *PDGFRB* or *FGFR1*. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 108 Orazi A, Bennett JM, Germing U, Brunning RD, Bain BJ and Thiele J (2008) Chronic myelomonocytic leukaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 109 Vardiman JW, Bennett JM, Bain BJ, Brunning RD and Thiele J (2008) Atypical chronic myeloid leukaemia, *BCRABL1* negative. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 110 Baumann I, Bennett JM, Niemeyer CM, Thiele J and Shannon K (2008) Juvenile myelomonocytic leukaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 111 Castro-Malasina H, Schaison G, Passe S, Pasquier A, Bergen R, Bayle-Weisgerber C et al. (1984) Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). *Cancer*, **54**, 675–686.
 - 112 Vardiman JW, Bennett JM, Bain BJ, Baumann I, Thiele J and Orazi A (2008) Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
 - 113 Blatt J, Penchansky L and Horn M (1989) Thrombocytosis as a presenting feature in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Am J Hematol*, **31**, 46–49.
 - 114 Bain BJ and Catovsky D (1994) The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol*, **48**, 189–193.

- 115 Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG and Gralnick H and Sultan C (1989) Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid Leukaemias. *J Clin Pathol*, **42**, 567–584.
- 116 Bain BJ, Clark D and Wilkins BS (2010) *Bone Marrow Pathology*, 4th edn. Wiley–Blackwell, Oxford.
- 117 Metzgeroth G, Schneider S, Hofmann W-K and Hastka J (2013) Globular intracytoplasmic inclusions in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **161**, 302.
- 118 Merino A, Rozman M and Esteve J (2006) Chronic (B cell) lymphocytic leukaemia with unusual granulation. *Br J Haematol*, **133**, 354.
- 119 Dorion RP and Shaw JH (2003) Intracytoplasmic filamentous inclusions in the peripheral blood of a patient with chronic lymphocytic leukemia: a bright-field, electron microscopic, immunofluorescent, and flow cytometric study. *Arch Pathol Lab Med*, **127**, 618–620.
- 120 Girodon F, Poillot N, Martin I, Carli PM and Maynadie M (2004) Crystalline inclusions in B monoclonal lymphocytes. *Haematologica*, **89**, ECR40.
- 121 Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N *et al.* on behalf of The International Familial CLL Consortium (2005) Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*, **130**, 325–332.
- 122 Nguyen D and Diamond L (2000) *Diagnostic Hematology: a Pattern Approach*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- 123 Melo JV, Catovsky D and Galton DAG (1986) The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterisation of an intermediate group. *Br J Haematol*, **63**, 377–387.
- 124 Machii T, Yamaguchi M, Inoue R, Tokumine Y, Kuratsune H, Nagai H *et al.* (1997) Polyclonal B-cell lymphocytosis with features resembling hairy cell leukemia-Japanese variant. *Blood*, **15**, 2008–2014.
- 125 Groom DA, Wong D, Brynes RK and Macaulay LK (1991) Auer rod-like inclusions in circulating lymphoma cells. *Am J Clin Pathol*, **96**, 111–115.
- 126 Bain BJ, Matutes E, Robinson D, Lampert IA, Brito-Babapulle V, Morilla R and Catovsky D (1991) Leukaemia as a manifestation of large cell lymphoma. *Br J Haematol*, **77**, 301–310.
- 127 Cobcroft R (1999) Images in haematology: diagnosis of angiotropic large B-cell lymphoma from a peripheral blood film. *Br J Haematol*, **104**, 429.
- 128 Liapis K and Apostolidis J (2012) Empty, but heavy, plasma cells. *Blood*, **120**, 4282.
- 129 Kyle RA, Maldonado JE and Bayrd ED (1974) Plasma cell leukaemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med*, **133**, 813–818.
- 130 McKenna RW, Kyle RA, Kuehl WM, Grogan TM, Harris NL and Coupland RW (2008) Plasma cell neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon.
- 131 Murayama K, Sawamura M and Tamura K (1993) Transient plasmacytosis with acute infection in myeloma. *Br J Haematol*, **82**, 475.
- 132 Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM and Greipp PR (1996) Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*, **88**, 1780–1787.
- 133 Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H and Bradwell AR (2001) Serum free light-chains measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*, **97**, 2900–2903.
- 134 Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ *et al.* (2005) Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, **106**, 2276–2279.
- 135 Duncan SC and Winkelman RK (1978) Circulating Sézary cells in hospitalized dermatology patients. *Br J Dermatol*, **99**, 171–178.
- 136 Morice WG, Kurtin PJ, Leibson PJ, Tefferi A and Hanson CA (2003) Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **120**, 1026–1036.
- 137 Portlock CS, Donnelly GB, Qin J, Straus D, Yahalom J, Zelenetz A *et al.* (2004) Adverse prognostic significance of CD20 positive Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, **125**, 701–708.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Índice

Os números de páginas em *itálico* referem-se a figuras; os números em **negrito** referem-se a tabelas.

A

- Abbott Cell-Dyn, contador eletrônico, 49-52, 49, 50
- abetalipoproteinemia, 87, 88
- acantocitose, 86-89, 87, 88, **89**
- ácido fólico, deficiência de, 324-329
- AcT 5diff, contador automático, 37-38, 38
- adenilatoquinase, deficiência de, **355**
- adenosina desaminase, excesso de, **355**
- Aids/HIV, 422, 423
- Alder-Reilly, anomalia de, 110, **111**, 124
- alcooolismo, anemia do, 327-329
- aldolase, deficiência de, **354**
- Alport, síndrome de, 114
- alterações quantitativas das células sanguíneas, 232-276
- anemia, 245-248, **246**, **247**
 - basopenia, 251, **251**
 - eosinopenia, 251, **251**
 - leucocitose, 234-241, **235**
 - leucopenia, 248
 - linfocitopenia (linfopenia), 251-252, **252**
 - linfocitose, 241-242, **242**
 - monocitopenia, 251
 - monocitose, 242-243, **243**
 - neutropenia, 248-249, **249**, **250**
 - pancitopenia, 256-258, **257**
 - plasmocitose, 243, **243**
 - poliglobulia, 232, **233**, **234**
 - reticulocitopenia, 248, **248**
 - reticulocitose, 232, **234**
 - trombocitopenia, 252-256, **253-256**
 - trombocitose, 243-245, **244**, **245**
- amplitude de distribuição da hemoglobina (HDW), **216**
- amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW)
- erros na, **193**, 195
 - valores de referência em adultos, **216**
- análise genética molecular, 292
- anemia(s), 245-248, **246**, **247**, *ver também condições individuais*
- aplástica, 381-382
 - conceito, 245
 - da intoxicação por chumbo, 301-302, 302
 - de células falciformes, 91, 312-316, 313-315
 - diagnóstico diferencial, 314-315
 - exames adicionais, 315
 - hemograma na, 312-314, 313-315
 - de Diamond-Blackfan, 382
 - de doença crônica, 298-299, **298**, 299
 - de Fanconi, 382, **387**
 - diseritropoética, 377-380, **377**, 378-380
 - adquirida, 380-381
 - congenita, 377-380, **377**, 378-380
 - ferropênica, 295-298, 296, **298**
 - hemograma na, 245, 247-248, **247**
 - hemolítica(s), *ver também condições individuais*
 - adquirida(s), 359-357, *ver também condições individuais*
 - aloimune, 365-367
 - autoimune com anticorpos quentes e frios, 363
 - autoimune com anticorpos quentes, 359-361, 359, 360
 - autoimune, 359-362, 359, 360, 362-363
 - da deficiência neonatal de glutatão-peroxidase, 373
 - da doença hepática, 373, 374
 - da síndrome autoimune/linfoproliferativa familiar, 366
 - das infecções por bactérias e parasitos, 375
 - do diabetes melito, 375
 - do recém-nascido, 364-365, 365
 - hemoglobinúria da marcha, 375-376
 - hemoglobinúria paroxística a frio, 362-363, 363
 - hemoglobinúria paroxística noturna, 376, 376
 - induzida por agentes oxidantes, 371-373, 372, 373
 - induzida por drogas, 363-364, 364
 - na doença de Wilson, 373, 374, 375
 - na doença renal, 373
 - não imunológicas, 366-373, **366-367**
 - por crioaglutininas, 361-362, 362
 - por deficiência de vitamina E, 375
 - por depleção de fosfato, 375
 - por picadas de ofídios e artrópodes, 375, 375
- congenita(s), 330-359, *ver também condições individuais*
- crio-hidrocitose, 330-331
 - crio-hidrocitose por deficiência de estomatina, 346
 - deficiências enzimáticas do eritrócito, 347-350, 348, 349
 - eliptocitose hereditária, 337-340, 338-340

esferocitose hereditária, 331-337, 332-336
 estomatocitose hereditária, 343-344, **343**, 344
 ovalocitose do Sudeste Asiático, 342-343, 342
 piropecilocitose hereditária, 340-342, 343
 pseudo-hiperpotassemia familiar, 345-346
 sitosterolemia, 346-347
 xerocitose hereditária, 344-345, 345
 leucoeritroblástica, **247**
 macrocítica(s), 323-330
 do alcoolismo e da doença hepática, 330
 nas síndromes mielodisplásicas, 330
 megaloblástica(s), 118, 323-329, **324**, 325-329
 causas, **324**
 diagnóstico diferencial, 328-329
 hemograma na, 324-328, 324-328
 normocítica normocrômica, causas, **246**
 sideroblástica congênita, 299-301, 300-301
 anisocitose das plaquetas, 139
 anisocitose dos eritrócitos, 73
 anisocromia, 75, 76, 117
 anormalidades enzimáticas do eritrócito, 347-350,
 348, 349, *ver também condições individuais*
 anticoagulantes para coleta de sangue, 5-6
 aplasia eritroide pura, 382-383
 artefatos de conservação, 7, 69-71, 69-71
 artrópodes, picadas de, 375
 Auer, bastões de, 109-110, 112

B

Babesia divergens, **154**, 165
Babesia equi, **154**
Babesia microti, **154**, 164
 babesiose, 164-165, 164, 165
 bactérias em distensões sanguíneas, 148-152, 148-152
 bartonelose, 150
 basofilia, 240-241, **241**
 basófilos, 122-123, 123
 valores de referência
 em adultos, **217**
 em crianças, **222**
 na gravidez, **223**
 basopenia, 251, **251**
 bastões de Auer, 109-110, 112
 Batten, doença de, 124-125
 Batten-Spielmeyer-Vogt, doença de, 109, 125
 Bayer, contadores eletrônicos
 contagens errôneas nos
 contagens diferenciais, 199-200, **199**, 200-202
 leucócitos, 190
 Beckman-Coulter, contadores eletrônicos, 30-38, 30,
 32, 33, **34**, 36-38
 AcT 5diff, 37-38, 38
 contagem diferencial em 5 partes, 31-35, 33, **34**
 contagens errôneas de leucócitos nos, 190
 plataforma Hematoflow, 35, 37
 Unicel DxH 800, 35, 36-37
 Bernard-Soulier, síndrome de, **388**, 391
Borrelia, 148
buffy coat, distensões de, 10
 Burkitt, linfoma de, 469
Butterfly (escalpe), cânula, 2

C

Cabot, anéis de, 96, 97
Candida parapsilosis, 142
Capnocytophaga canimorsus, 149
 CD59, deficiência genética de, **347**
 células grandes não coradas (LUCs)
 valores de referência
 em adultos, **217**
 em crianças, **222**
 células na distensão sanguínea
 amnióticas, 146
 de Mott, 127, 127
 desintegradas, 136-137, 136
 em cacho de uva, 127
 em cesto, 137
 em mórlula, 127
 endoteliais, 145, 145
 epiteliais, 145, 146
 gordurosas, 146, 146
 LE, 116
 linfoides apoptóticas, 129, 129
 malignas não hematopoéticas, 146-148, 147, 148
 não hematopoéticas, 145-148
 necrobióticas, 117, 118
 necróticas da medula óssea, 137
 células tumorais agregadas, 68
 células sanguíneas, morfologia das, 67-185,
 ver morfologia das células sanguíneas
 CHCM, *ver concentração hemoglobínica corpuscular*
 média
 Chédiak-Higashi, anomalia de, **111**, 112, 121, 123, 124,
 131, 138
 chumbo, intoxicação por, 301-302, 302
 Churg-Strauss, síndrome de, 239
 citogenética, análise, 291-292
 citomegalovírus, 128
 citometria em fluxo, 287, 289-290, 289-290
 citoquímica, 277-288, **277**, *ver também técnicas*
 específicas
 no diagnóstico e na classificação de leucemias, 280-288
 para células com Hb F, 279, 279
 para corpos de Heinz, 277-278, 277
 para ferro, reação de Perls, 279-280, 280
 para G6PD, 280
 para inclusões de Hb H, 278-279, 278
 coleta de sangue, 1-7
 agitação da amostra, 7
 anticoagulante e contêiner, 3, 5-6
 capilar, 4-5, 4
 ferimento com agulha, 6-7
 diretrizes, 6
 do cordão, 5
 efeito nos parâmetros hematológicos, **212**
 ordem recomendada, **4**
 seringas e agulhas, 2, 3
 venoso periférico, 1-4, 2, 3, **4**
 coloração de distensões sanguíneas, 11-12, 12
 para parasitos da malária, 12
 concentração hemoglobínica corpuscular média
 (CHCM), 17, **29**
 erros na, **193**, 195
 valores de referência em adultos, 216

conservação
 de espécimes, 60
 de lâminas, 13

contadores automatizados de células sanguíneas, 29-59
 Abbott (Cell-Dyn), 49-52, 49, 50
 Beckman-Coulter, 30-38, 30, 32, 33, **34**, 36-38
 contagens errôneas nos, 186, **187**, **188**, 198-205,
199, 200-203, **204-205**
 por identificação automática de imagem, 29
 Horiba ABX, 52, 53
 Mindray, 52-53
 Nihon Kohden, 52
 princípios de operação, 29-30
 reticulócitos e plaquetas, contagens de, 53-59,
 54-58, **59**
 Siemens, 44-49, 45, 47, 48
 Sysmex, 38-44, 39-41

contagem diferencial de leucócitos, 23-25, **24**, **25**
 células não identificáveis, 25
 erro na identificação de células na, 24-25
 falta de reprodutibilidade da, 25, **25**
 inexatidão da, 24-25
 má distribuição das células na, 24, 24

contagens de glóbulos, 17-66
 conservação de amostras, 60
 erros nas, *ver erros nas contagens de glóbulos*
 unidades e abreviações aprovadas, 28-29, **29**

crenação, 69

crioaglutininas, 67

crioglobulina, cristais de, 70

crioglobulinemia, 115, 132

crio-hidrocitose por deficiência de estomatina, 346

crio-hidrocitose, 346

D

dacriócitos, 84, 84

desvio à direita, 100-101

desvio à esquerda, 99-100

diabetes melito, hemólise no, 375

Diamond-Blackfan, anemia de, 382

2,3-difosfoglicerato, deficiência de, **355**

DiGeorge, síndrome de, **388**

dimorfismo, 76, 76

discócitos, 80

distensões sanguíneas, 7-13, 7-10, *ver também condições individuais*
 arquivo de lâminas, 13
 artefatos de armazenamento, 7, 69-71, 69-71
 automatizadas, 10
 coloração de, 11-12, **12**
 com anticoagulante EDTA, 7
 do concentrado de leucócitos (*buffy coat*), 10
 em amostras com Hct alto, 10
 em pessoas saudas
 adultas, 142
 com hipoesplenismo, 143-144, **144**
 na infância, 143
 no recém-nascido, 143, 144
 exame de, 15, 67-71, 67-71
 feitas com bordo de lâmina, 8-10, 9, 10
 fixação de, 10-11, 11

gota espessa, 10, 11

microrganismos em, 148-168

montagem de, 12-13

preparações a fresco, 10

sem anticoagulante, 8

distúrbios linfoproliferativos de linhagem T, 472-477

distúrbios linfoproliferativos, morfologia dos linfócitos
 nos, 129-130, 129, 130

doença hemolítica do recém-nascido, 364-365, 365

Döhle, corpos de, 106, 113-114, 113

Dorfman-Chanarin, síndrome de, 112

Down, síndrome de, 142
 leucemia mieloide aguda na, 443
 mielopoese transiente anormal na, 441, 442-443

drepanócitos (eritrócitos falciformes), 93-94, 94, 95

drepanocitose (anemia de células falciformes),
 312-315, 313-315

drepanocitose/ β -talassemia, 316-317, 317

drepanocitose/hemoglobinopatia C, 317-318, 318

drumstick, 100, 101-102

E

eliptocitose, 82-83, 83
 hereditária, 337-340, 338-340

enolase, deficiência de, **339**

eosinofilia, 236-240, **236-240**
 com infiltração pulmonar, **240**
 em parasitoses, **237-238**
 hipereosinofilia mediada por células T, 426
 na síndrome hipereosinofílica idiopática, 426-428, 427
 reacional, 425-426, 425, **426**

eosinófilos, 112-115, 112-115
 valores de referência
 em adultos, **217**
 em crianças, **222**
 em recém-nascidos, **219**
 na gravidez, **223**

eosinopenia, 251, **251**

Epstein, síndrome de, 114, **389**

equinocitose, 69, 84-86, 85, **85**, 86

eritroblastos, 69
 valores de referência em recém-nascidos, **219**

eritrócitos
 aglutinação dos, 72, 97-98, 98
 anormalidades enzimáticas dos, 347-350, 348, 34,
ver condições individuais
 brotamentos (*budding*) nos, 70
 contagem de, 22-23, **29**
 erros na, **192**, 194-195
 valores de referência
 em adultos, **216**
 em crianças, **221**
 em recém-nascidos, **218**
 na gravidez, **223**

cristais nos, 97, 97

distúrbios dos, 295-415, *ver distúrbios individuais*

em alvo (*target cells*), 91-92, 91, **92**

em chapéu de Napoleão, 95

em lágrima (dacriócitos), 84, 84

espiculados, 84

falciformes (drepanócitos), 93-94, 94, 95

fragmentação dos, 70, **366-367**
 inclusões nos, 94-95
 índices, 23
 irregularmente contraídos, 81-82, 82
 membrana dos, 332
 defeitos da, 347-359, **347**
 microrganismos nos, 97
 morfologia normal e anormalidades, 72-98,
 ver também tipos individuais
 nucleados, *ver* eritroblastos
 pinçados (em cogumelo), 94, 95
 rosetas de, 97-98, 98
rouleaux, formação de, 97-98, 98
 erliquiose, 150
 erros nas contagens de glóbulos, 186-210
 automatizadas, 186-188
 causas de, **187, 188**
 diferenciais automatizadas, 198-205, **199, 200-203, 204-205**
 HCM, CHCM e RDW, **192, 195**
 hemoglobina, 191-194, **191-193**
 eritrócitos, VCM e Hct, **178, 192, 194-195**
 leucócitos, 188-191, **189, 190**
 plaquetas, 195-197, **195, 196, 198**
 reticulócitos, 205-206, **205**
 escalpe (*butterfly*), cânula, 2
Escherichia coli, 152
 esferocitose, 79-81, 80, **80, 81**
 hereditária, 331-337, 332-336
 esferoequinócitos, 84, 86
 esquizócitos, 89-91, 90
 esterases combinadas, citoquímica, 287
 esterases não específicas, citoquímica, 286-287, 287
 estomatocitose, 92-93, 93
 hereditária, 343-344, **343, 344**
 estromas eritrocíticos na distensão sanguínea, 82
 exames complementares, 277-294
 análise citogenética, 291-292
 análise genética molecular, 292
 exame ultraestrutural, 292-293, 293
 fluorescência com hibridização *in situ* (FISH), 292
 imunofenotipagem, 288-289, 289
 técnicas citoquímicas, 277-288, **277**
 exames junto ao paciente, 59-60
 métodos não invasivos, 59-60

F

Fanconi, anemia de, 382, **387**
 Fechtner, síndrome de, **381**
 ferimento com agulha, 6
 ferro, deficiência de, 295-298, 296, **298**
 feto
 trombocitopenia no, **256**
 valores de referência no, 216-220, 220
 fibrina, filamentos na distensão sanguínea, 69
 filaríose, 168-169, 169-171
 fluorescência com hibridização *in situ* (FISH), 292
 fórmula leucocitária, *ver* contagem diferencial de leucócitos
 fosfatase ácida, citoquímica, 288, 288

fosfatase alcalina nos neutrófilos, citoquímica, 281-282, **281, 282, 283, 284**
 fosfato, depleção de, 375
 fosfofrutoquinase, deficiência de, **354**
 fosfoglicerato, deficiência de, **355**

G

G6PD, *ver* glicose-6-fosfato desidrogenase
 glicose-6-fosfato desidrogenase, 280
 deficiência de, 350-352, 350, 351, **356**
 glicosefosfato-isomerase, deficiência de, **354, 357**
 γ-glutamilcisteína-sintase, deficiência de, **356**
 glutatião-peroxidase, deficiência de, **356, 358**
 glutatião-redutase, deficiência de, **356**
 glutatião-sintase, deficiência de, **356**
 gota espessa, 10, 11
 granulação tóxica nos neutrófilos, 109, 109, 110
 granulócitos
 morfologia dos, 99-123
 basófilos, 122-123, 123
 eosinófilos, 119-122, 119-122
 neutrófilos, 99-118, 99
 precursores dos, 133-135, 134, 135
 metamielócitos, 135, 135
 mieloblastos, 134
 mielócitos, 134, 135
 promielócitos, 134, 134
 valores de referência para adultos, **217**
 gravidez
 hemograma na, 143
 valores de referência na, 223, **223**

H

hairy cell leukemia, 464-466, 465
 variante, 466, 466
 HCM, *ver* hemoglobina corpuscular média
 Heinz, corpos de, **27, 82, 373**
 citoquímica para, 277-278, 277
 hematócrito, 17, 19-21, **29**
 aumentado, distensões sanguíneas com, 10
 erros no, **192**
 método de referência, 21
 micro-hematócrito, 20, 20, **21**
 retenção de plasma no, 20-21
 valores de referência
 em adultos, **216**
 em crianças, **221**
 em recém-nascidos, **218**
 na gravidez, **223**
 Hematoflow, plataforma, 35, 37
 hemoflagelados, 165-167, 166-167
 hemoglobina C/β-talassemia, 320, 320
 hemoglobina Constant Spring, 95
 hemoglobina corpuscular média (HCM), 17, **29**
 erros na, **193, 195**
 valores de referência
 em adultos, **216**
 em crianças, **221**
 hemoglobina de Bart, hidropisia fetal por, 311-312, 311

hemoglobina, dosagem de, 17-19, **18**, **29**
 erros na, 191-194, **191-193**
 método da cianometemoglobina, 17-19, **18**
 unidades recomendadas, 19
 valores de referência
 em adultos, **216**
 em crianças, **221**
 em prematuros, **223**
 em recém-nascidos, **218**
 na gravidez, **223**
 no feto, **220**
 hemoglobina E/ β -talassemia, 322, 322
 hemoglobina F, células contendo, 279, 279
 hemoglobina H
 citoquímica para, 278-279, 278
 inclusões de, **27**
 hemoglobina S, 317
 hemoglobina S/ β -talassemia, 316-317, 317
 hemoglobina S-Oman, 95
 hemoglobinas instáveis, 322-323, 323
 hemoglobinopatia C, 82, 318-319, 319
 hemoglobinopatia C, traço da, 319-320, 320
 hemoglobinopatia E, 320-321, 310
 hemoglobinopatia E, traço da, 321-322, 321
 hemoglobinopatia H, 309-311, 310, 311
 hemoglobinopatia SS (drepanocitose, anemia de células falciformes), 312-315, 313-315
 hemoglobinopatia S/C, 317-318, 318
 hemoglobinopatias, 312-323, *ver também condições individuais*
 hemoglobinúria da marcha, 375-376
 hemoglobinúria paroxística a frio, 362-363, 363
 hemoglobinúria paroxística noturna, 376, 376
 hemólise por infusão hipotônica, 376
 hepatopatia, 373, 374
 Hermansky-Pudlak, síndrome de, 124, 138
 hexoquinase, deficiência de, **354**
 hipercoagulabilidade, 69
 hipercromia, 76
 hiperlipidemia, 71
 hipertermia induzida por cocaína, 107
 hipocromia, 75-76, 75
 hipoesplenismo, 143-144, **144**
Histoplasma capsulatum, 153
 HIV/aids, 422-423, 422, 423
 Hodgkin, linfoma de, 476-477
 Horiba-ABX, contadores eletrônicos, 49
 Howell-Jolly, corpos de, **27**, 91, 94-95, 150

I

imunocitoquímica, 289, 292
 imunofenotipagem, 288-289, 289, 291, 292
 aplicações da, **290-291**
 índices hematimétricos, 22
 erros nos, 191-195, **192**, **193**
 infecções bacterianas
 alterações do leucograma nas, 416-418, 416
 anemia hemolítica nas, 375
 em distensões sanguíneas, 148-152, 148-152
 infecções fúngicas, 151, 153

infecções virais, leucograma nas, 418-424

J

Jordan, anomalia de, 112, 124

K

Klebsiella oxytoca, 151
 Kleihauer, teste de, 248
 “knizócitos”, 92

L

lactato-desidrogenase, deficiência de, **355**
 lâminas, conservação de, 13
Leishmania donovani, **154**, 166, 167, 168
 leptócitos, 76
 leucemia(s)
 basofílica aguda, 438, 440, 440
 classificação e diagnóstico, 280-288
 de células cabeludas (*hairy cells*), *ver* tricoleucemia
 de linfócitos grandes e granulares, 475, 475
 eosinofílica crônica, 451, 457
 sem outras especificações, 450-452, 451, 452
 granulocítica crônica, *ver* leucemia, mielóide crônica
 linfoblástica aguda, 457-460, 458-460, **459**
 linfocítica crônica, 117, 129, 461-463, 462, 463
 mastocítica, 440-442, 442, **442**
 mielóide aguda, 109, 113, 118, 432-440, **433**, 434-442
 classificação da OMS, **433**
 classificação FAB, **433**
 da síndrome de Down, 443
 hemograma na, 432, 434-442
 mielóide crônica, 446-448, 447, 448
 fase acelerada, 448-450, 449, **449**
 mielóide crônica atípica, 452-454, 453, **454**
 mielomonocítica crônica, 116, 454-455, 454
 mielomonocítica infantil, 455-456, 455, **456**
 monoblástica aguda, 184
 neutrofílica crônica, 450, 450
 plasmocítica, 470-472, 471
 promielocítica aguda, 52, 288, 292, **433**, 435, 438, 438
 prolinfocítica
 de linhagem B, 464, 464
 de linhagem T, 472-473, 472
 leucemia/linfoma de células T do adulto, 474-475, 475
 leucemoides, reações, 428-431
 linfóides, 430-431, 430, 431
 mielóides, 428-429, 429, 430
 leucócitos, contagem de, **29**, 222
 contagem diferencial, 23-25, 24, **25**
 erros na, 198-205, **199**, 200-203, **204-205**
 erros na, 188-191, **189**, 190
 valores de referência
 em adultos, **217**
 diferenças étnicas, **217**
 em crianças, **222**

em recém-nascidos, **219**
na gravidez, **223**
leucócitos, distúrbios dos, 416-481, *ver condições individuais*
leucócitos, morfologia dos, 98-123, *ver diferentes tipos*
leucocitoses, 234-241, **235**
basofilia, 240-241, **241**
eosinofilia, 236-240, **236-240**
neutrofilia, 234, 236, **236**
leucoeritroblásticas, distensões sanguíneas, 135-136
leucopenia, 248
linfocitopenia (linfopenia), 251-252, **252**
linfócitos, 123-130, *123-130*
anormalidades morfológicas, 124-125, *124, 125, 126*
alterações reacionais, 125-128, *126-129*
nos distúrbios linfoproliferativos, 129-130, *129, 130*
valores de referência
em adultos, **217**
em crianças, **222**
em recém-nascidos, **219**
na gravidez, **209**
linfocitose, 241-242, **242**
monoclonal de células B, 463-464
policlonal persistente de células B, 424-425, *425*
linfoma
conceito, 460
cutâneo de células T, 473-474, *475*
de Burkitt, 469
de células do manto, 469, *469*
de células T, 475-476, *476*
de Hodgkin, 476-477
esplênico com linfócitos vilosos, 466-467, *467*
folicular, 468-469, *468*
linfoplasmocítico, 467-468, *467*
linfoma/leucemia de células T do adulto, 474-475, *475*
linfopenia (linfocitopenia), 251-252, **252**
linfoproliferativos, distúrbios, 129-130, *129, 130*
líquido amniótico, células do, 146
Loa loa, **154**, 169, *171*
lúpus eritematoso, 116, *116*

M

macrocitose, 74-75, *74*
causas de, **75**
macrófagos na distensão sanguínea, 132-133, *133*
macropolícitos, 116-117, *117*
malária, 114, 115, 132, 140, 152-164, **153**, *154-163*
coloração dos parasitos, 12
Mansonella ozzardi, **154**, 169
Mansonella perstans, **154**, 169, *171*
Maroteaux-Lamy, síndrome de, *110, 131*
mastócitos, 136, *136*
mastocitose, 452, *453*
May-Hegglin, anomalia de, **111**, *114, 389*
McLeod, fenótipo de, **349**
megacariócitos na distensão sanguínea, 140-142, *141, 142*
metamielócito, 135, *135*
microcitose, 73-74, **73-74**
micro-hematócrito, 20, **20, 21**

microrganismos na distensão sanguínea, 148-168,
ver também diversas espécies
Babesia, 164-165, *164, 165*
bactérias, 148-150, *148-150*
filárias, 168-169, *169-171*
fungos, 151, *153*
hemoflagelados, 165-167, *166, 167*
parasitos, 152-171, **154**, *156-165*
Plasmodium, 152-164
toxoplasma, 165
microscópio, instalação e uso, 13-15, *14*
mieloblastos, 134
mielócitos, 134, *135*
mielodisplasia, *106*
mielofibrose primária, 397-398, *398*
mieloma múltiplo, 67, 68, 470-472, *471*
mieloperoxidase, citoquímica, 282-284, *285*
Miller, micrômetro ocular de, 28, *28*
Mindray, contadores eletrônicos, 52-53
monocitopenia, 251
monócitos, 130-131, *131-132*
precursores dos, 131-132
valores de referência
em adultos, **217**
em crianças, **222**
em recém-nascidos, **229**
na gravidez, **223**
monocitose, 242-243, **243**
mononucleose infecciosa, 418-422, *419, 420, 421*
Montreal, síndrome plaquetária, **390**
morfologia das células sanguíneas, 67-185
células não hematopoéticas, 145-148
distensão sanguínea em pessoas sadias, 142-145,
144, 144
eritrócitos, 72-98
leucócitos, 98-123
megacariócitos, 140-142, *141, 142*
microrganismos na distensão sanguínea, 148-168,
ver também condições individuais
Morquio, síndrome de, 124

N

naftol AS-D cloroacetato esterase, citoquímica, 286,
286, 287
Napoleão, células em chapéu de, 95
Neisseria meningitidis, *149*
neoplasias linfóides/mielóides com anormalidades de
PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1, *457*
neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, 452-457
inclassificáveis, 456-457
neoplasias mieloproliferativas, 446-448, **446**, *447, 448*
neuroacantocitose, **349**
neutrofilia, 234-236, **236**
neutrófilos, 99-118, *99*
agregação, 118, *118, 119*
anormalidades citoplasmáticas, 107-114, **108**
bastões de Auer, 109-110, *112*
corpos de Döhle, 113-114, *113*
granulação aumentada, 109, *109, 110*
granulação reduzida, 107, *109*

inclusões exógenas, 114-116, 115, 116
 vacuolização citoplasmática nos, 111-113, 113
 anormalidades nucleares, 100-107, **103**
 anomalia de Pelger-Huët, 104, 104, 105, 120, 122
 bastonados e desvio à esquerda, 99-100, 100, **103**
 contagem de lobos e desvio à direita, 100-101, 101
 cromatina densa, **103**
drumsticks, 100, 101-102, 102
 fragmentos nucleares destacados, **103**
 hipersegmentação, **103**
 hipossegmentação, **103**
 nódulos sésseis, 102, 102
 núcleo botrioide, **103**
 núcleo em anel, **103**, 106
 necrobióticos, 117, 118
 valores de referência
 em adultos, **217**
 em crianças, **222**
 em recém-nascidos, **219**
 na gravidez, **223**
 neutropenia, 248-249, **249**, **250**
 cíclica, 431-432
 congenita grave, 431
 em distúrbios adquiridos, **250**
 em distúrbios hereditários, **249**
 Niemann-Pick, doença de, 124
 Nihon Kohden, contador eletrônico, 52-53

O

ofídios, picada de, 375, 375
Onchocerca volvulus, **154**
 Oroya, febre de, 150
 ovalocitose, 82-83, 83
 do Sudeste Asiático, 342-343, 342

P

pancitopenia, 184, 256-258, **257**
 hemograma na, 257-258
 Pappenheimer, corpos de, **27**, 96, 96
 parasitoses, 152-165, **154**, 156-165
 anemia hemolítica em, 375
 eosinofilia nas, **237-238**
 malária, 152-164, **153**, 154-163
 Paris-Trousseau, trombocitopenia de, 140, **387**
 PAS (reação do ácido periódico de Schiff), citoquímica, 287-288, 287
 pecilocitose, 78-97, 78, 79, *ver também tipos específicos*
 Pelger-Huët, anomalia de, **103**, 104, 104, 105, 120, 122, **389**
Penicillium marneffei, 142
 Perls, reação para ferro, 279-280, 280
 pirimidina-5'-nucleotidase, deficiência de, **355**, 358
 piropecilocitose hereditária, 78, 340-342, 343
 piruvatoquinase, deficiência de, 352-354, 353, **355**
 plaquetas, 137-140, 138-140, **138**
 agregação, 68
 anormalidades de distribuição, 137-140, 139, 140
 anormalidades de tamanho, 137, 138, **138**, 139
 reticuladas, 57-59

 satelitismo, 140, 140
 volume, **29**
 plaquetas, contagem de, 22-23, **29**
 automatizada, 57-59
 erros na, 195-197, **195**, **196**, 198
 valores de referência, 224-225, **224**, **225**
 na gravidez, **223**
 plaquetas, distúrbios das, 386-398
 plaquetócrito, **29**
 plasmócito, 130
 plasmocitose, 243, **243**
Plasmodium falciparum, 114, 115, 132, 140, **154**, 156-157, 160
Plasmodium knowlesi, 151-152, **154**, 162-163
Plasmodium malariae, **154**, 156-157, 161
Plasmodium ovale, **154**, 156-157, 159
Plasmodium vivax, **154**, 156-157, 158-159
 policitemia vera, 383, 384
 policromatofilia (policromasia), 76-78, 77
 poliglobulia, 232, **233**, **234**, 383-386
 relativa, 383, 386
 secundária, 385-386
 verdadeira, 383
 Pompe, doença de, 124
 pontilhado basófilo, 95-96, 96
 porfiria eritropoética congênita, 97
 precursores granulocíticos, *ver* granulócitos, precursores dos
 promielócitos, 134, 134
 pseudo-hiperpotassemia familiar, 345
 punção venosa, 1-4, 2, 3, **4**
 púrpura trombocitopênica
 autoimune, 393-394, 393
 imunológica pós-infecciosa, 394
 trombótica, 394-395

Q

Quebec, distúrbio plaquetário, **387**
 queratócitos, 89, 90

R

RDW (amplitude de distribuição dos eritrócitos)
 erros na, **193**, 195
 valores de referência em adultos, **216**
 reações leucemoides, 428-431, **428**
 linfoides, 430-431, 430, 431
 mieloides, 428-429, 429, 430
 recém-nascido
 doença hemolítica, 364-365, 365
 hemograma no, 143, 144
 glutatio- peroxidase, deficiência de, 373
 trombocitopenia no, **256**
 valores de referência no, 218-220, **218**, **219**
 eosinófilos, **219**
 eritroblastos, **219**
 eritrócitos, **218**
 hematócrito, **218**
 hemoglobina, **218**, **221**
 leucócitos, **219**

linfócitos, **219**
 monócitos, **219**
 neutrófilos, **219**
 VCM, **218**
 Reed-Sternberg, células de, 148
 reticulocítico, índice, 28
 reticulocitopenia, 248, **248**
 reticulócitos, contagem de, 26-29, 26, 27, **27**, 28, **28**, **29**
 automatizada, 53-55, 54-58, **59**
 erros na, 205-206, **205**
 valores de referência, 225-226, **226**
 reticulócitos, imaturidade dos, 55-57
 reticulocitose, 232, **234**
 Rh, síndrome de deficiência, **349**

S

Sanfilippo, síndrome de, 125
 satelitismo plaquetário, 140, 140
 Sebastian, síndrome de, **389**
 Sézary, síndrome de, 473-474, 473
 Siemens Advia, contadores automáticos, 44-49, 45, 47, 48
 contagens errôneas nos, 199-200, **199**, 202, 203
 síndrome(s) (de), *ver também pelos nomes próprios*
 das plaquetas brancas, **388**
 das plaquetas cinzentas, **388**, 392
 falcêmicas, 312-318
 Fechtner, **389**
 hemolítico-urêmica, 89, 369
 hipereosinofílica idiopática, 426-428, 427
 linfoproliferativa autoimune familiar, 366
 Maroteaux-Lamy, 110, 131
 Medich, **389**
 mielodisplásicas, 443-446, 444-446, **444**
 anemia macrocítica associada com, 330
 classificação da OMS, **444**
 classificação FAB, **444**
 Montreal, **390**
 Paris-Trousseau, 140, **387**
 Sebastian, **389**
 Sézary, 473-474, 473
 velocardiofacial, **388**
 Wiskott-Aldrich, 138, 139, **386**
 York, **389**
 Zieve, 374
 Sistosterolemia, 346-347
 Sudan black B, citoquímica, 284-285, 285
 Sysmex, contadores eletrônicos, 38-44, 39-41
 contagens errôneas nos, 200-203, **204-205**
 SE-9000, 38-40, 39
 série XN, 44
 XE-2100, 40-43, 40, 41
 XE-2100D, 43
 XE-5000, 43-44
 XT-2000i, 44

T

talassemia(s), 302-311
 α -talassemia, traço, *ver* talassemia, traço α -talassêmico
 β -talassemia intermédia, 307, 307, 308

β -talassemia maior, 354-307, 306
 β -talassemia menor, *ver* traço β -talassêmico
 traço α -talassêmico, 308-309, 309
 traço β -talassêmico, 302-305, 303, 304
 diagnóstico diferencial, 304-305
 exames adicionais, 305
 hemograma no, 302-304, 303
target cells (eritrócitos em alvo), 91-92, 91, 92
 Tay-Sachs, doença de, 124, 125
tear drop cells, *ver* dacriócitos
 toxoplasmose, 165
 traço falciforme (drepanocítico), 316
 tricoleucemia (*hairy cell leukaemia*), 464-466, 465
 variante, 466, 466
 triosefosfato-isomerase, deficiência de, **355**, 357
 trombocitemia essencial, 395-397, 396
 trombocitopenia, 252-256, **253-256**, 386-393,
 386-390, 391, 392
 amegacariocítica, **387**
 causas de, **253-256**
 no feto, **256**
 no recém-nascido, **256**
 congenita, 386-393, **386-390**
 de Paris-Trousseau, 140, **387**
 dismegacariopoética, **387**
 hemograma na, 255-256
 ligada ao sexo, **386**, **389**
 púrpura trombocitopênica autoimune, 393-394, 393
 púrpura trombocitopênica imunológica
 pós-infecciosa, 394
 púrpura trombocitopênica trombótica, 394-395
 trombocitose, 243-245, **244**, **245**
 hemograma na, 244-245
 familiar, 387-388
Tropheryma whipplei, 150
Trypanosoma brucei gambiense, **154**, 166-167
Trypanosoma brucei rhodesiense, **154**, 166
Trypanosoma cruzi, **154**, 166, 167, 167
Trypanosoma evansi, 167
Trypanosoma gambiense, **154**, 166-167
Trypanosoma rangeli, **154**, 166
Trypanosoma rhodesiense, **154**, 166
 tuberculose, leucograma na, 418

U

ultraestrutura, exame da, 292-293, 293
 Unicl DxH 800, contador automático, 35, 36-37

V

valores de referência, 211-232
 na gravidez, 223, **223**
 em adultos, 216-218, **216**, **217**
 em crianças, 220-223, **221-223**
 em recém-nascidos e fetos, 218-220, **218**, **219**, 220
 para parâmetros hematológicos, **221**, **214**, **215**
 para reticulócitos, 225-226, **226**
 VCM, *ver* volume corpuscular médio
 veias basilica e cefálica, 2
 velocardiofacial, síndrome, 388
 velocidade de sedimentação globular (VSG), 29

vírus linfotrópico de células T humanas, 424, 424
vitamina B₁₂, deficiência de, 324-329, **324**
vitamina E, deficiência de, 375
volume corpuscular médio (VCM), 17, **29**
 erros no, **192-193**, 194-195
 valores de referência
 em adultos, **216**
 em crianças, **221**
 em recém-nascidos, **218**
 na gravidez, **223**
volume plaquetário médio (VPM), **29**
von Willebrand, doença de, **390**
VPM, *ver* volume plaquetário médio

W

Whipple, doença de, 150

Wilson, doença de, 373, 374, 375
Wiskott-Aldrich, síndrome de, 138, 139, **386**
Wuchereria bancrofti, **154**, 169, 170

X

xerocitose hereditária, 344-345, 345

Y

Yersinia pestis, 151
York, síndrome plaquetária de, **389**

Z

Zieve, síndrome de, 374

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.